

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO Y REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN
SUBCELULAR DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PacC POR EL PH AMBIENTAL.**

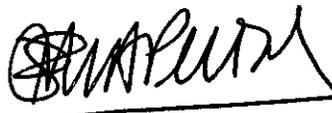
MEMORIA PRESENTADA POR JOSÉ MANUEL MINGOT ASCENCAO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR.

Director de la tesis:

Miguel Ángel Peñalva Soto.

Investigador científico del C.S.I.C.

Centro de Investigaciones biológicas.



Tutor:

Margarita Fernández García de Castro.

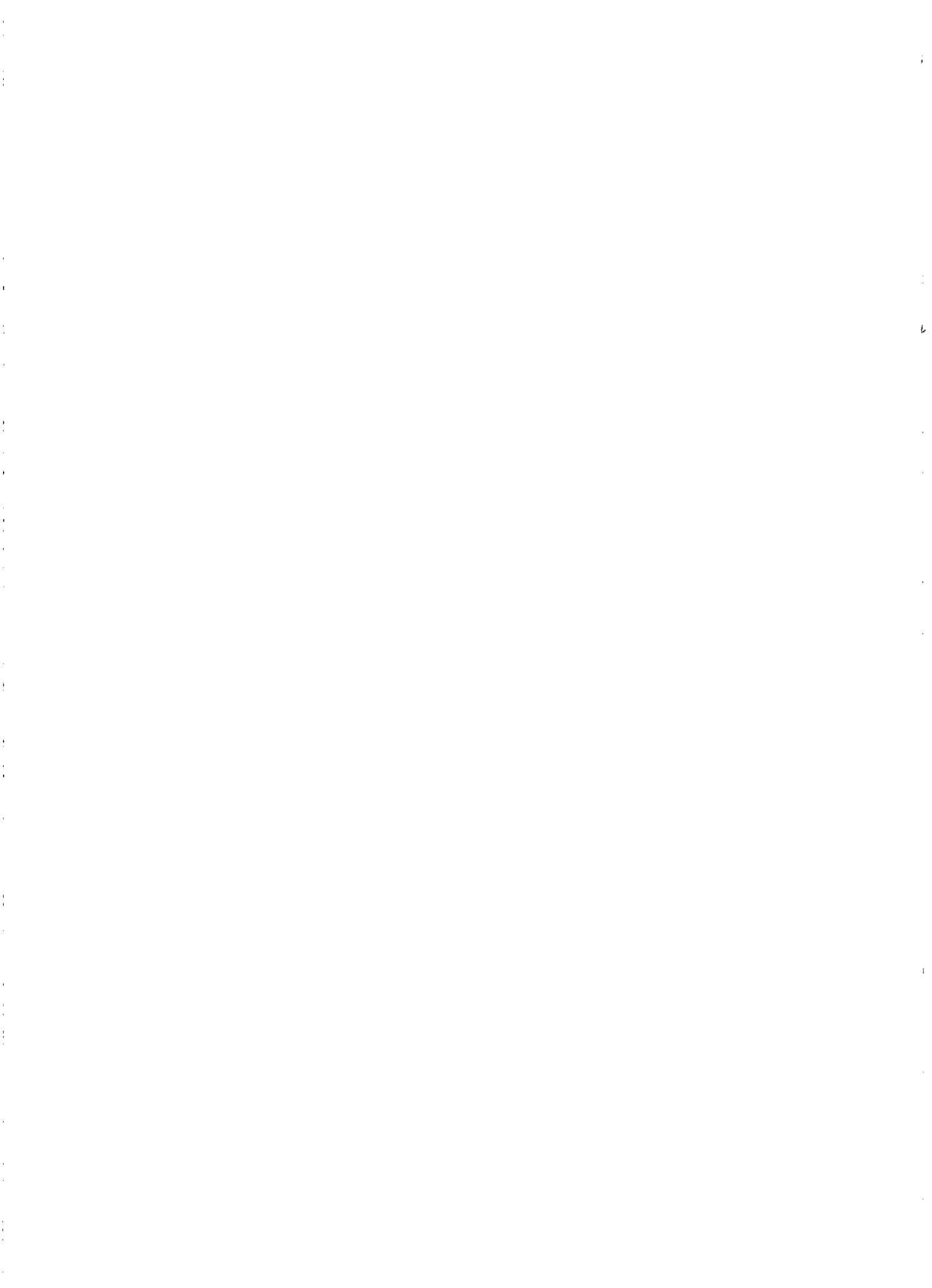
Profesora titular de Universidad.

Dpto. de Bioquímica y Biología molecular II

Facultad de Farmacia. U.C.M.



A Lourdes



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. con la ayuda de una beca del programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Por ello, quisiera mostrar mi agradecimiento a estas dos instituciones por haber contribuido de esta forma a la realización de esta Tesis Doctoral.

En segundo lugar, quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la consecución de este trabajo:

Al Dr. Miguel Ángel Peñalva Soto, por haber dirigido este trabajo y por la confianza que desde un principio ha depositado en mí; la paciencia con la que ha soportado estos "largos" meses de escritura y la actitud crítica y profesional que ha demostrado a lo largo de estos estimulantes años.

A mis compañeros de laboratorio, Teresa, Eduardo, Elena, Eli, Josué, y Secho con los que he podido compartir todo tipo de alegrías y me han mostrado siempre todo su apoyo en los momentos difíciles.

A Chema, Marga y Beatriz, que, aunque ya no están en el laboratorio, contribuyeron a enseñarme a dar mis primeros pasos en el complejo mundo de la ciencia.

A todos los miembros del laboratorio del Prof. H. N. Arst, Jr., en el *Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital*, Londres, sin cuya colaboración no hubiera sido posible llevar a cabo gran parte de este trabajo. En especial quiero agradecerle su colaboración al Prof. H. N. Arst, Jr, a la Dra. Joan Tilburn, a la Dra. Susana Negrete, a Elaine Bignell y a Christopher V. Brown, con los que conviví durante tres semanas y con los que ha sido un verdadero placer colaborar en el estudio de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans*.

Al Prof. Claudio Scazzocchio por enviarme el plásmido PAN 52-1 sGFP.

A los amigos que durante estos años he tenido oportunidad de hacer en el "mundillo" de la investigación, Beatriz, Guillermo, Belén, Pepe, Mariano, Pilar y Christian, que siempre me han animado y han constituido una fuente constante de estimulación.

A Pilar y Jose.

A mi familia.

A Lourdes, por haberme animado constantemente y haberme aguantado en los momentos difíciles.

ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| BSA | Albúmina de suero bovino. |
| c.p.m. | Cuentas por minuto. |
| Ci | Curio. |
| Da | Dalton |
| D.O. | Densidad óptica. |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol. |
| DEPC | Dietil-pirocarbonato. |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico. |
| DNA pol. | DNA polimerasa. |
| DNasa | Desoxirribonucleasa. |
| EDTA | Ácido etilén-diamino-tetracético. |
| EMSA | Ensayo de cambio de movilidad electroforética. |
| EST | "Expressed Sequence Tag". |
| GFP | Proteína verde fluorescente ("Green Fluorescent protein"). |
| GST | Glutation S-transferasa. |
| hnRNP | Ribonucleoproteína heteronuclear |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido. |
| kb | 1000 pares de bases. |
| kDa | 1000 Daltons. |
| MCA | Medio completo de <i>Aspergillus</i> . |
| MES | Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-2-etanosulfónico. |
| MFA | Medio de fermentación de <i>Aspergillus</i> . |
| MMA | Medio mínimo de <i>Aspergillus</i> . |
| MOPS | Ácido 3-[N-morfolin] sulfónico |
| M_r | Masa molecular relativa. |
| mRNA | RNA mensajero. |
| NES | Señal de exportación nuclear ("nuclear export signal"). |
| NLS | Señal de localización nuclear ("nuclear localization signal"). |
| NPC | Complejo del poro nuclear ("nuclear pore complex"). |
| ORF | Pauta abierta de lectura ("Open reading frame"). |
| P.C.R. | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| PNK | Polinucleótido quinasa |
| p/v | Peso/volumen. |

| | |
|--------|--|
| pb | Pares de bases. |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto. |
| RNA | Ácido ribonucleico. |
| RNasa | Ribonucleasa. |
| SDS | Dodecil sulfato sódico. |
| SREBP | Proteína de unión a elementos de regulación por esteroides. ("Sterol Regulatory element Binding Protein") |
| TEMED | N,N,N',N'- tetrametil-etilén-diamina. |
| Tris | Tri-hidroximetil-aminometano. |
| ts | Termosensible. |
| u. | Unidad. |
| UsnRNP | Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, ricas en uridina |
| U.V. | Ultravioleta. |
| v/v | Volumen/volumen. |
| X-gal | 5 bromo-4 cloro-3 indol-β-D-tiogalactopiranosido. |

Los aminoácidos se nombran según los códigos de una o dos letras recomendados por la IUB-IUPAC.

Los desoxirribonucleótidos se abrevian según el código recomendado por la IUB-IUPAC.

| | |
|---|------------------|
| A | deoxiadenosina |
| G | deoxiguanosina |
| C | deoxicitidina |
| T | deoxitimidina |
| R | deoxipurinas |
| Y | deoxipirimidinas |
| S | dC o dG |

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. <i>Aspergillus nidulans</i>. | 3 |
| 1.1 Aspectos generales. | 3 |
| 1.2 Ventajas de <i>A. nidulans</i> como organismo modelo para la investigación básica en organismos eucariotas. | 3 |
| 1.3 Ciclo de vida. | 4 |
| 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR EL PH AMBIENTAL. | 7 |
| 2.1 Descubrimiento de la regulación por pH ambiental. | 7 |
| 2.2 Análisis genético formal del sistema regulador por pH. | 8 |
| 2.3 El factor de transcripción PacC. | 11 |
| 2.4 El gen <i>pacC</i> y el modelo molecular de la regulación por pH ambiental en <i>A. nidulans</i> . | 15 |
| 2.5 Los genes <i>pal</i> . | 19 |
| 2.6 Los genes <i>pacM</i> y <i>pacX</i> . | 21 |
| 2.7 Homólogos de <i>pacC</i> . | 21 |
| 3. ACTIVACIÓN POR PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. | 23 |
| 3.1 Factores de transcripción regulados por procesamiento proteolítico que son modulados negativamente en “trans”. | 24 |
| 3.2 Factores de transcripción regulados por procesamiento proteolítico que son modulados negativamente en “cis”. | 26 |
| 4. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL INTERIOR NUCLEAR. | 31 |
| 4.1 Regulación de la actividad de factores de transcripción mediante la regulación de su localización nuclear. | 34 |
| 4.1.1 Enmascaramiento de la NLS por fosforilación. | 34 |
| 4.1.2 Enmascaramiento de la NLS por interacciones intermoleculares. | 36 |
| 4.1.3 Enmascaramiento de la NLS por interacciones intramoleculares. | 37 |
| 4.1.4 Factores de transcripción anclados a membranas celulares. | 37 |
| 4.1.5 Factores de transcripción cuya localización nuclear se regula modulando su importación y su exportación nuclear. | 38 |
| 5. OBJETIVOS DE LA TESIS. | 38 |
| 6. RESUMEN DE RESULTADOS. | 39 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| 1. MICROORGANISMOS. | 42 |
| 1.1 Estirpes de Bacterias. | 42 |
| 1.2 Estirpes de <i>Aspergillus nidulans</i> . | 42 |

| | |
|---|----|
| 2. VECTORES. | 42 |
| 3. MEDIOS DE CULTIVO. | 47 |
| 3.1 Medios para <i>E.coli</i> . | 47 |
| 3.2 Medios para <i>Aspergillus nidulans</i> . | 48 |
| 3.2.1 Medio completo (MCA). | 48 |
| 3.2.2 Medio mínimo(MMA). | 48 |
| 3.2.3 Medio de fermentación (MFA). | 48 |
| 3.3 Soluciones y suplementos para medios de <i>A. nidulans</i> . | 49 |
| 3.3.1 Solución de sales. | 49 |
| 3.3.2 Solución de casaminoácidos. | 49 |
| 3.3.3 Solución de elementos traza. | 49 |
| 3.3.4 Solución de vitaminas. | 49 |
| 3.3.5 Suplementos. | 49 |
| 4. SOLUCIONES DE USO GENERAL. | 50 |
| 5. PRODUCTOS RADIOACTIVOS. | 51 |
| 6. OTROS. | 51 |
| 7. MANIPULACIÓN DE <i>E. coli</i>. | 51 |
| 7.1 Preparación de células competentes. | 51 |
| 7.2 Transformación. | 51 |
| 8. MANEJO DE <i>Aspergillus nidulans</i>. | 52 |
| 8.1 Medios de cultivo y mantenimiento de las cepas de <i>A. nidulans</i> . | 52 |
| 8.2 Obtención de conidiosporas para inóculo de cultivos en medio líquido. | 52 |
| 8.3 Condiciones de cultivo en medio líquido. | 52 |
| 8.4 Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i> . | 52 |
| 8.5 Expresión génica regulada por el promotor de la alcohol deshidrogenasa (<i>alcA^P</i>). | 53 |
| 8.6 Técnicas de genética formal. | 54 |
| 9. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. | 55 |
| 9.1 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> . | 55 |
| 9.2 Purificación de fragmentos de DNA. | 55 |
| 9.3 Síntesis de oligonucleótidos. | 56 |
| 9.4 Apareamiento de oligonucleótidos sintéticos complementarios. | 56 |
| 9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.). | 57 |
| 9.6 Aislamiento de DNA de <i>Aspergillus nidulans</i> . | 57 |
| 9.7 Análisis de fragmentos de DNA por el método de Southern. | 58 |
| 9.8 Aislamiento de RNA de <i>A. nidulans</i> . | 58 |

| | |
|---|-----|
| 9.9 Análisis del RNA por el método de northern. | 59 |
| 9.10 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA. | 59 |
| 9.10.1 Marcaje de sondas para análisis por los métodos de Southern y northern. | 59 |
| 9.10.2 Marcaje terminal de fragmentos para experimentos de EMSA. | 60 |
| 9.11 Secuenciación automática de DNA. | 60 |
| 9.12 Cuantificación de radiactividad. | 60 |
| 9.13 Preparación de extractos totales de proteínas de <i>A. nidulans</i> . | 61 |
| 9.14 Fraccionamiento subcelular de <i>A. nidulans</i> . | 61 |
| 9.15 Inmuno detección de proteínas por la técnica de <i>western</i> . | 62 |
| 9.15.1 Antisueros utilizados. | 63 |
| 9.16 Ensayos de cambio de movilidad electroforética. | 63 |
| 10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES. | 64 |
| RESULTADOS. PARTE I. Activación proteolítica de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino. | 65 |
| 1.1 Relación precursor-producto entre el producto primario de traducción y la forma procesada de PacC. | 66 |
| 1.2 El procesamiento de PacC no afecta al extremo amino terminal de la proteína. El principal codón de inicio de la traducción es el codón AUG 5. | 74 |
| 1.3 Determinación del límite de procesamiento de PacC. | 76 |
| 1.4 Mutaciones en <i>pacC</i> que afectan al procesamiento. | 78 |
| 1.4.1 Mutaciones "missense" que mimetizan alcalinidad favorecen la accesibilidad de PacC a la proteasa procesativa. | 78 |
| 1.4.2 Mutaciones que resultan en proteínas insensibles a la señal de pH ambiental. | 80 |
| RESULTADOS. PARTE II. Localización nuclear de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino. | 83 |
| 2.1 Localización subcelular de PacC. | 84 |
| 2.2 El pH ambiental regula <i>in vivo</i> la localización subcelular de PacC. | 89 |
| 2.3 Los dedos de zinc de PacC son suficientes para localizar la forma procesada de la proteína en el núcleo. | 101 |
| 2.3.1 La secuencia 252-KKR...KRR-269 no es necesaria para la localización nuclear de la forma procesada de PacC. | 101 |
| 2.3.2 Los dedos de zinc de PacC son suficientes para dirigir la localización nuclear de GFP. | 111 |

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| 2.4 El extremo carboxilo terminal de PacC modula negativamente su localización nuclear. | 120 |
| RESULTADOS. PARTE III. Autorregulación de <i>pacC</i>. | 123 |
| 3.1 La forma procesada de PacC no es suficiente para activar la expresión de <i>pacC</i> . | 124 |
| 3.2 La forma sin procesar de PacC parece modular negativamente la función <i>pacC</i> . | 134 |
| DISCUSIÓN | 139 |
| 1. Activación proteolítica de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino. | 140 |
| 2. Localización nuclear de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino. | 142 |
| 3. <i>pacC</i> no regula positivamente su propia expresión. | 147 |
| 4. El producto primario de traducción de <i>pacC</i> puede modular negativamente la función <i>pacC</i> . | 148 |
| 5. Actualización del modelo de regulación por pH ambiental en <i>A. nidulans</i> . | 151 |
| CONCLUSIONES | 155 |
| BIBLIOGRAFÍA | 157 |
| PUBLICACIONES | 171 |

INTRODUCCIÓN

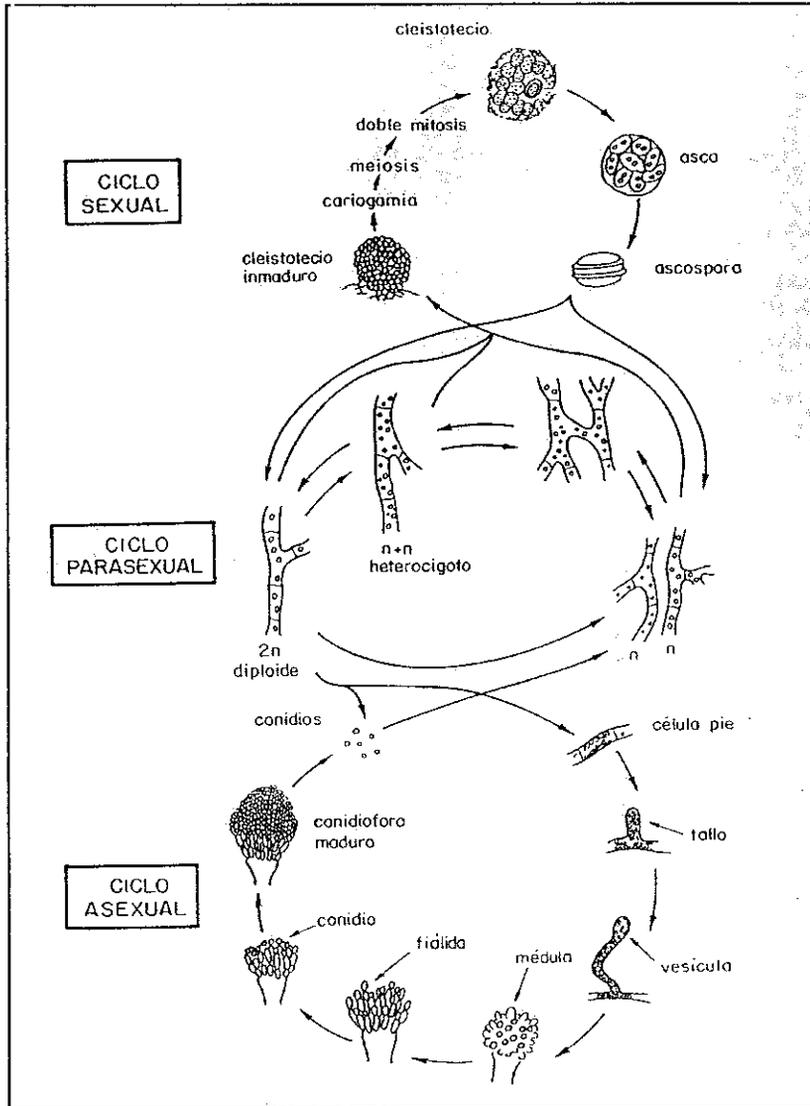


Figura 1. Ciclos de vida vegetativo, sexual y parasexual de *A.nidulans*.

1. *Aspergillus nidulans*.

1.1 Aspectos generales.

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso clasificado en la clase *ascomycetes*, orden *plectomycetes* por la morfología de sus estructuras para la reproducción sexual (Thom y Raper, 1945; Pontecorvo *et al.*, 1953). Los hongos filamentosos son un grupo de organismos de gran importancia industrial. Así, las levaduras unicelulares se utilizan en la fabricación de pan, vino y cerveza, y los hongos filamentosos en la fabricación de antibióticos (DeTilly *et al.*, 1983), ácidos orgánicos, y diversas enzimas utilizadas en la industria alimentaria o en el tratamiento de residuos industriales (Bodie *et al.*, 1994). También son importantes fitopatógenos (Leong y Holden, 1989; Valent y Chumley, 1991) y actúan como patógenos oportunistas en enfermos inmunodeprimidos (Cohen, 1991). Además de su importancia industrial, los hongos ascomicetos se utilizan como sistema modelo para la investigación básica de procesos celulares tanto a nivel de genética molecular (estructura y regulación de genes, transducción de señales, regulación del ciclo celular...) como en genética formal (estudios de recombinación genética).

1.2 Ventajas de *A. nidulans* como organismo modelo para la investigación básica en organismos eucariotas.

Aspergillus nidulans es un organismo modelo para la investigación básica en eucariotas. Combina muchas de las características útiles de las bacterias con las de los organismos eucariotas superiores. Al igual que las bacterias, puede cultivarse con facilidad tanto en medio líquido como sólido; es extraordinariamente versátil metabólicamente, pudiendo utilizar prácticamente cualquier fuente de carbono o nitrógeno, y la propagación de clones resulta extremadamente sencilla. Al igual que en los organismos superiores existe una alternancia regular de generaciones asociada con un ciclo sexual. Sin embargo la fase principal del crecimiento es haploide, lo que permite detectar la expresión de mutaciones recesivas en cada generación. Algunas de las ventajas experimentales de *A. nidulans* con respecto a otros sistemas eucariotas, que han permitido utilizarlo como organismo modelo, se indican a continuación: i) es posible realizar análisis genético formal (Pontecorvo *et al.*, 1953); ii) gracias a su versatilidad metabólica se dispone de una gran colección de mutaciones en genes estructurales de rutas catabólicas o anabólicas (Clutterbuck, 1982), en genes reguladores específicos de ruta que median la inducción o la represión de los enzimas y permeasas de una

determinada ruta metabólica y en genes reguladores de amplio dominio que regulan varias de estas rutas, modulando las respuestas generales a diferentes factores ambientales (como la utilización preferencial de ciertas fuentes de carbono o nitrógeno (Arst y Scazzocchio, 1985), o la secreción de enzimas extracelulares dependiendo del pH del medio (ver sección 2 de esta introducción). iii) las técnicas de biología molecular están muy desarrolladas (Timberlake y Marshall, 1989). Así, se dispone de sistemas eficaces de transformación (integrativa), como los basados en *trpC* (Yelton *et al.*, 1984) y en *argB* (Johnstone, 1985) (este último ha sido ampliamente utilizado en esta tesis), y de una tecnología de genes reporteros bien establecida (Van Gorcom *et al.*, 1986; Hamer y Timberlake, 1987). Por otra parte, las técnicas de transformación (Tilburn *et al.*, 1983), ampliamente desarrolladas, permiten realizar disrupciones génicas, deletar genes o hacer reemplazamientos génicos con relativa facilidad. Además se puede modular la expresión de genes mediante el uso de promotores regulables, como el promotor de la alcohol deshidrogenasa (Adams *et al.*, 1998; Fernández-Cañón y Peñalva, 1995), que ha sido utilizado en esta tesis.

1.3 Ciclo de vida.

A.nidulans es un organismo homotático cuyas células vegetativas, que contienen múltiples núcleos haploides, crecen por extensión apical formando largos filamentos (hifas) que se dividen por ramificación. Las hifas, que están segmentadas mediante tabiques o septos perforados que permiten el tránsito de nutrientes y efectores entre las distintas células, están especializadas en la adquisición de nutrientes del medio y frecuentemente secretan enzimas degradativas con el fin de facilitar la disponibilidad de algunos sustratos. Las hifas pueden entrar en contacto y fusionarse (anastomosis) intercambiando así material citoplásmico y núcleos. Si la anastomosis ocurre entre dos estirpes genéticamente distintas se forma un individuo heterocarionte que tiene núcleos haploides de las dos estirpes parentales (Pontecorvo *et al.*, 1953).

El ciclo vegetativo de *A. nidulans* (Fig. 1) (Pontecorvo *et al.*, 1953; Timberlake y Marshall, 1988; revisado por Timberlake, 1990) comienza con la germinación de una espora asexual (conidiospora), uninucleada y haploide, que da lugar, por sucesivas mitosis, a las hifas multinucleadas. Una de las células (pie) se diferencia y forma una estructura aérea multinucleada (tallo, Fig. 2A) que crece por extensión apical. Cuando el tallo ha alcanzado una altura aproximada de 100 μm , el crecimiento polarizado cesa y la parte superior del tallo se ensancha formando una vesícula terminal (Fig. 2B) en la que los núcleos se multiplican. Sobre la superficie de la vesícula se desarrollan por gemación, y de forma simultánea, del orden de 60 células denominadas médulas o esterigmatas primarios (Fig. 2C), a cada una de las cuales

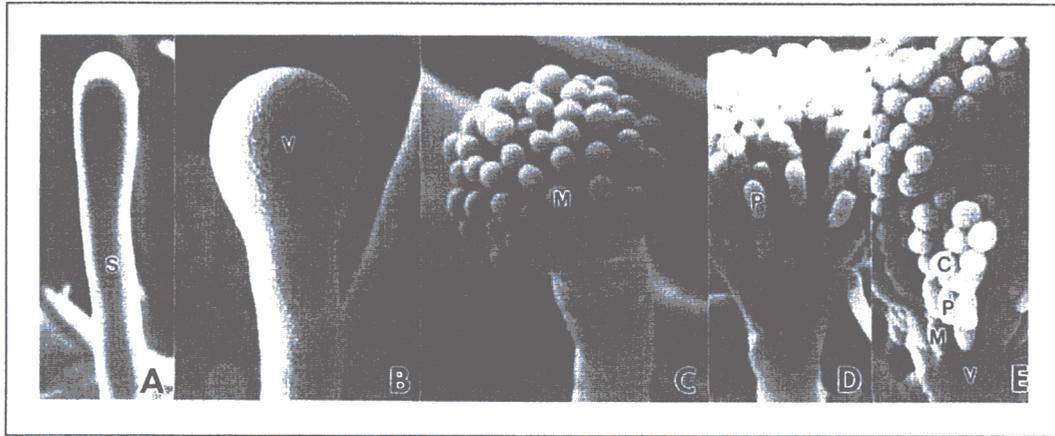


Figura 2. Fotografías de microscopía electrónica de barrido mostrando los distintos estadios del desarrollo de los conidióforos. A) Tallo (S) de un conidióforo inmaduro en un estadio anterior a la formación de la vesícula. B) Conidióforo inmaduro en el que se está formando la vesícula (V). C) Conidióforo inmaduro en el que ya se han formado las médulas. D) Conidióforo inmaduro en el que ya se han formado las fiálidas (P) E) Conidióforo maduro en el que pueden apreciarse las conidiosporas (o esporas asexuales) (c), las fiálidas (p), las médulas (m) y la vesícula (v). Tomado de Timberlake y Clutterbuck (1994).

migra un único núcleo. Las médulas quedan separadas de la vesícula por tabiques perforados similares a los que segmentan las hifas. Después de alcanzar una longitud de aproximadamente $5 \mu\text{m}$, en la zona apical de cada médula se forma, por gemación, una nueva célula a la que migra un único núcleo procedente de la división mitótica del núcleo de la médula. La nueva célula formada (fiálida o esterigmata secundario (Fig. 2D)) queda separada de la médula por un tabique perforado, de forma que existe una continuidad citoplásmica entre estas nuevas células y el micelio sobre el que se han formado. La formación de los conidios o conidiosporas (forma de resistencia y dispersión del hongo (Fig. 2E)) se inicia mediante la formación de una gema en la parte apical de la fiálida. Al mismo tiempo el núcleo de la fiálida se divide mitóticamente, situándose uno de los núcleos en la parte basal de la célula y el otro en la gema que se ha formado. A partir de ese momento comienza la diferenciación del conidio que se completa con la formación de la pared celular. El conidio recién formado, si bien es una estructura completamente independiente de la fiálida, permanece físicamente unido a su célula madre. El núcleo basal de la fiálida se divide nuevamente por mitosis formando un nuevo conidio que desplaza al anteriormente formado. La repetición de este proceso da lugar a la formación de largas cadenas de conidios (aproximadamente 100 conidios por cadena) todos ellos uninucleados, haploides y con idéntica dotación genética, siendo el último formado el más próximo a la fiálida. Todos estos tipos celulares, desde el pie hasta los conidios, constituyen la estructura de reproducción asexual del hongo denominada conidióforo, cuya morfología,

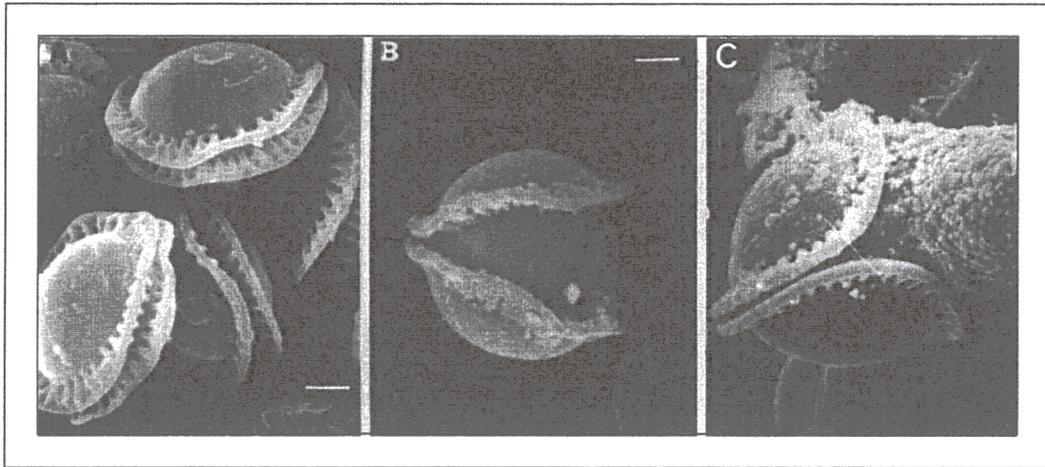


Figura 3. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando ascosporas de *A. nidulans* y su germinación. (A) Ascosporas. (B-C) Dos estadios de la germinación de las ascosporas. Barras de escala: 1 μ m. Tomado de Champe *et al.* (1994).

característica de los *plectomicetes*, tiene valor taxonómico. En *A. nidulans* los conidióforos son de pequeño tamaño, el tallo tiene forma de columna, es de aspecto sinuoso y termina en una vesícula semiesférica. (Thom y Raper, 1945; Fig. 2). La facilidad de obtención de un gran número de conidios unicelulares haploides ha sido un factor determinante en el desarrollo de las técnicas de análisis genético formal en *A. nidulans*.

Además del ciclo vegetativo, *A. nidulans* puede atravesar un ciclo sexual (Pontecorvo *et al.*, 1953; Fig. 1). Las estructuras celulares se denominan cleistotecios o peritecios. Los cleistotecios son estructuras esféricas de 100 a 200 μ m de diámetro que contienen de 10 a 100000 ascas, estructuras con forma de saco que contienen las esporas sexuales o ascosporas. El cleistotecio está rodeado por una pared celular dura, brillante, de color marrón oscuro o negro que no se rompe con facilidad. Recubriendo esta pared se encuentran las denominadas células de Hulle, células de gran tamaño y color pardo que posiblemente constituyan una reserva de nutrientes para la germinación de las ascosporas. El paso inicial de la formación del cleistotecio consiste en la formación (mediante anastomosis de hifas de una misma estirpe o estirpes diferentes) de una hifa dicariótica en la que los núcleos se sitúan próximos entre sí y se dividen sincrónicamente mediante mitosis. Esta hifa se propaga formando una población de células dicarióticas todas ellas contenidas en un mismo cleistotecio. Los dos núcleos de cada una de estas células se fusionan finalmente formando un diploide transitorio que se divide por meiosis. Los cuatro productos meióticos resultantes se dividen nuevamente por mitosis originando ocho ascosporas haploides. Antes de que las ascosporas maduren totalmente, cada núcleo se divide mitóticamente sin que haya división celular, de

forma que cada asca contiene ocho ascosporas binucleadas, de forma discoidal y con dos características crestas (Fig. 3). Tras la ruptura del cleistotecio las ascas liberan las ascosporas que germinan tan rápidamente como los conidios iniciando un nuevo ciclo de vida vegetativo.

Finalmente *A. nidulans* puede atravesar un tercer ciclo de vida denominado ciclo parasexual (Fig. 1). Este ciclo implica la formación de una estirpe diploide que se obtiene tras la anastomosis de hifas de una misma estirpe o estirpes diferentes y posterior fusión de los núcleos. Las estirpes diploides, de aspecto similar a las estirpes haploides, pueden haploidizar espontáneamente, pero dicha haploidización es poco frecuente y se puede inducir mediante el uso de agentes que interfieren con la migración de los cromosomas en la anafase mitótica como la *p*-fluorofenil alanina (McCully y Forbes, 1965) o el benomilo (Upshall *et al.*, 1977). En este proceso se produce intercambio cromosómico entre las cepas parentales produciéndose muy raramente sobrecruzamientos meióticos.

2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR EL pH AMBIENTAL.

2.1 Descubrimiento de la regulación por pH ambiental.

Los microorganismos saprofitos (como *A. nidulans* o *P. chrysogenum*) están expuestos a continuas variaciones en las características físico-químicas y biológicas del medio ambiente, entre las que se encuentran las variaciones de pH. La supervivencia a distintos valores de pH requiere un sistema homeostático que preserve el interior celular de los cambios de pH externos, una amplia variedad de enzimas extracelulares y permeasas que permitan la supervivencia a los diferentes valores de pH y un sistema regulador por pH ambiental que asegure que las distintas permeasas, enzimas extracelulares y metabolitos secretados sólo se sinteticen a su pH óptimo de actuación (por ejemplo, que las fosfatasas extracelulares ácidas o alcalinas sólo se sinteticen cuando el pH extracelular es ácido o alcalino, respectivamente). *A. nidulans* es un microorganismo extraordinariamente versátil, capaz de crecer en un amplio rango de valores de pH ambiental (desde pH 2.5 hasta pH 10.5 (Rossi y Arst, 1990)). Posee un eficiente mecanismo homeostático (Caddick *et al.*, 1986a) que mantiene el pH intracelular constante (con lo que las enzimas intracelulares están protegidas de los efectos del pH externo) y es el único organismo en el que la caracterización genética y molecular del sistema regulador por pH está lo suficientemente avanzada como para haber permitido elaborar un modelo capaz de explicar la regulación de la expresión de genes estructurales de expresión preferente tanto a pH ácido como alcalino. La caracterización del sistema regulador por pH en *A. nidulans* supone un primer paso para entender cómo los microorganismos y,

presumiblemente ciertas células vegetales, regulan la expresión génica en respuesta al pH ambiental.

Los primeros experimentos que más tarde permitirían identificar el sistema regulador por pH ambiental en *A. nidulans* fueron realizados por Dorn (1965 a, b), quien identificó y aisló un gran número de mutaciones que afectaban a la actividad de las fosfatasas ácidas y/o alcalinas. Los efectos pleiotrópicos de algunas de las mutaciones aisladas por Dorn sugerían que éstas debían estar implicadas en funciones distintas a la hidrólisis de ésteres de fosfato. Así, Arst y Cove, (1970) encontraron que algunas de estas mutaciones resultaban en un aumento de la resistencia a concentraciones tóxicas de molibdato y tungstato con respecto a una estirpe silvestre mientras que otras disminuían la tolerancia a estos aniones y Arst *et al.*, (1980) mostraron cómo algunas de estas mutaciones afectan al transporte de ácido γ -aminobutírico (GABA). Posteriormente Caddick *et al.*, (1986a) demostraron que seis de los supuestos genes estructurales de las fosfatasas originalmente identificados por Dorn (*pal A*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F* y *pacC*) formaban parte del sistema regulador por pH ambiental de *A. nidulans*. Más tarde, Arst *et al.*, (1994) identificaron dos nuevos genes, *pall* y *palH*, que forman parte de este sistema y mostraron que las mutaciones en los genes *palE* y *palB* eran alélicas.

2.2 Análisis genético formal del sistema regulador por pH.

Diversas observaciones realizadas con una estirpe silvestre de *A. nidulans* ponían de manifiesto la existencia de un sistema regulador de la síntesis de enzimas extracelulares o permeasas por el pH ambiental. Así, en un medio sin fosfato, la actividad fosfatasa alcalina (detectada mediante técnicas de tinción de colonias en medio sólido (Dorn, 1965a; Caddick y Arst 1986, Caddick *et al.*, 1986b)) aumenta al aumentar el pH del medio de cultivo, siendo prácticamente nula a pH 5 y muy elevada a pH 8, mientras que la actividad fosfatasa ácida aumenta al disminuir el pH del medio siendo prácticamente indetectable a pH 8; la utilización de GABA como fuente de carbono o de nitrógeno es posible a pH ácido pero no a pH alcalino y tanto la sensibilidad a la toxicidad de la neomicina como la resistencia a la toxicidad del molibdato aumentan al aumentar el pH del medio de cultivo. Entre los genes que se expresan preferentemente a pH alcalino se encuentran *palD*, que codifica una fosfomonoesterasa alcalina (Caddick y Arst, 1986; Caddick *et al.*, 1986b), el gen de la proteasa alcalina, *prtA* (Tilburn *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1994; Sarkar *et al.*, 1996) y el gen de biosíntesis de penicilina, *ipnA*, que codifica la isopenicilina N-sintetasa (Espeso *et al.*, 1993; Espeso y Peñalva, 1996). Algunos de los genes que se expresan preferentemente a pH ácido son *pacA* que codifica una fosfomonoesterasa ácida (Caddick *et al.*, 1986b; Tilburn *et al.*, 1995) y *gabA* que codifica la principal permeasa del GABA (Caddick *et al.*, 1986a).

Las mutaciones que afectan a la regulación por pH fueron identificadas por alterar las respuestas al pH ambiental (Caddick *et al.*, 1986a; Arst *et al.*, 1994). En medios de cultivo sólidos, a pH 6.5, estas mutaciones son fenotípicamente de dos tipos: aquellas que mimetizan los efectos del crecimiento a pH ácido y aquellas que mimetizan los efectos de un crecimiento a pH alcalino. Las mutaciones en los seis genes *palA*, -B, -C, -F, -H e -I resultan en un fenotipo que mimetiza los efectos de un medio de cultivo ácido, con niveles elevados de fosfatasa ácida y permeasa del GABA, niveles reducidos de fosfatasa alcalina y una elevada sensibilidad al molibdato y resistencia a la neomicina. A excepción de las mutaciones en *palI*, que permiten cierto crecimiento a pH 8, estas mutaciones previenen el crecimiento a pH alcalino. El hecho de que las mutaciones en los genes *pal* se obtengan con una alta frecuencia, no sean aditivas, sean recesivas en diploides y fenotípicamente indistinguibles (a excepción de las mutaciones en *palI*), sugería que estas mutaciones son mutaciones de pérdida de función.

Las mutaciones que mimetizan los efectos del crecimiento a un pH alcalino son una clase de mutaciones en *pacC*. El primer alelo de este tipo fue identificado por Dorn (1965a) y posteriormente tanto Caddick *et al.* (1986a) como Tilburn *et al.* (1995) identificaron muchos más. Estos alelos mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino, de forma que resultan en niveles reducidos de la actividad de las fosfatasas ácidas, la fosfodiesterasa ácida y la permeasa del GABA, en una elevada sensibilidad a la neomicina y en niveles elevados de la actividad de las fosfatasas alcalinas y de producción de penicilina. A nivel transcripcional estas mutaciones resultan en niveles elevados de la transcripción de genes de expresión a pH alcalino (genes "alcalinos"), en niveles reducidos de la transcripción de genes de expresión a pH ácido (genes "ácidos") (Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1997; MacCabe *et al.*, 1998; Gielkens *et al.*, 1999; Hutchings *et al.*, 1999) y en niveles elevados del transcrito de *pacC* (Tilburn *et al.*, 1995). Estas mutaciones son mutaciones de ganancia de función (designadas *pacC^c*; Tilburn *et al.*, 1995). Un segundo tipo de mutaciones en *pacC* (mutaciones de pérdida de función designadas *pacC⁺*), mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido y así dan lugar a un fenotipo similar que el resultante de las mutaciones en los genes *pal* (Caddick *et al.*, 1986a; Arst *et al.*, 1994). Se diferencian de estas últimas por la menor sensibilidad al pH alcalino que confieren. Una mutación nula de *pacC* ($\Delta pacC$ o *pacC⁻*; Tilburn *et al.*, 1995) también mimetiza los efectos de un medio de cultivo ácido y, adicionalmente, resulta en criosensibilidad, una morfología anormal de la colonia y una ausencia casi total de conidiación. El hecho de que las mutaciones en el gen *pacC* fueran codominantes (mutaciones *pacC^c*) o recesivas (mutaciones *pacC⁺*) en diploides y epistáticas sobre las mutaciones en cualquiera de los genes *pal*, sugería que *pacC* podía ser un gen regulador de amplio dominio cuyo producto (PacC) regula directamente la expresión de los genes bajo su control en respuesta al pH ambiental. Los genes *pal* (cuyas mutaciones son recesivas en diploides y no son aditivas, *vide supra*) podrían estar implicados en la síntesis de

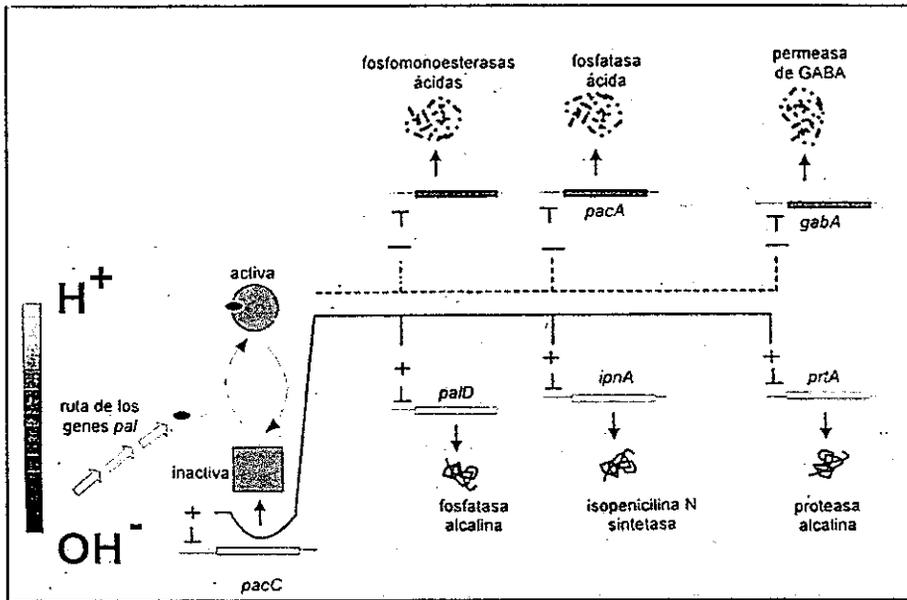


Figura 4. Modelo formal de la regulación por pH en *A. nidulans*. PacC activa la transcripción de genes alcalinos y reprime la expresión de genes ácidos en respuesta a la transducción de la señal de pH ambiental alcalino mediada por los productos codificados por los genes *pal*. En presencia de un pH ambiental ácido, PacC se encuentra en una forma inactiva, con lo que la expresión de genes ácidos está desreprimida y no se activa la expresión de genes alcalinos. Las mutaciones de pérdida de función en los genes *pal*, al prevenir la activación de PacC, mimetizan los efectos de un pH ácido. Las mutaciones *pacC^{+/−}* resultan en un fenotipo similar al de las mutaciones en los genes *pal*, ya que la proteína PacC mutante, incluso en presencia de una ruta *pal* funcional, es incapaz de regular la transcripción de los genes diana. Una mutación nula de *pacC* también mimetiza los efectos de un medio de cultivo ácido. Las mutaciones *pacC⁰*, por el contrario, mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino ya que los correspondientes productos génicos son activos incluso en ausencia de una ruta *pal* funcional.

un cofactor que modulara la actividad de PacC o bien podrían codificar los productos de una ruta de transducción de la señal de pH ambiental (Caddick *et al.*, 1986a). Basándose en estos datos, Tilburn *et al.* (1995) propusieron un modelo de regulación por pH (Fig. 4) mediado por *pacC*. Según el modelo, PacC es un represor transcripcional de genes que se expresan a pH ácido (genes "ácidos") y un activador transcripcional de genes que se expresan a pH alcalino (genes "alcalinos"). En respuesta a un pH ambiental alcalino, el producto primario de traducción de *pacC* se activa como consecuencia de la acción de los productos codificados por los genes *pal*. La forma activa resultante regula positivamente la transcripción de los genes "alcalinos" (como el gen de la fosfatasa alcalina) y regula negativamente la transcripción de los genes "ácidos" (como son los genes de la fosfatasa ácida y la permeasa del GABA). A valores ácidos de pH, PacC no es activo, de forma que no puede reprimir la expresión de genes "ácidos" ni activar la de los genes "alcalinos". Al prevenir la activación de PacC, la falta de función de los

genes *pal*, mimetiza los efectos de un medio de cultivo ácido. Las mutaciones *pacC*^{+/-}, de pérdida de función parcial, resultan en un fenotipo similar al de las mutaciones en los genes *pal*, ya que la proteína PacC mutante, incluso en presencia de una ruta *pal* funcional, es incapaz de regular la transcripción de los genes diana. Las mutaciones *pacC*^c, por el contrario, mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino ya que los correspondientes productos génicos son activos incluso en ausencia de una ruta *pal* funcional y, en consecuencia, sea cual sea el pH ambiental, la expresión de los genes alcalinos se ve favorecida y la expresión de los genes ácidos está reprimida.

2.3 El factor de transcripción PacC.

Posteriores trabajos permitieron confirmar la hipótesis de que PacC es un factor de transcripción que regula directamente la expresión de genes en respuesta al pH ambiental. Sha *et al.* (1991) mostraron que la producción de penicilina en *A. nidulans* está regulada por pH, de forma que los niveles de este antibiótico producidos en condiciones de cultivo alcalinas o por estirpes con mutaciones *pacC*^c son más elevados que los niveles producidos en condiciones de cultivo ácidas o por estirpes con mutaciones en los genes *pal*. Espeso y Peñalva (1996) mostraron que esta regulación tiene lugar a nivel de la transcripción de al menos uno de los genes estructurales de la biosíntesis de penicilina, *ipnA* (gen que codifica la isopenicilina N sintetasa). El análisis de la secuencia de *pacC* (Tilburn *et al.*, 1995) reveló que la proteína PacC es un polipéptido de 678 aminoácidos (en esta tesis se demuestra que el polipéptido está formado por 674 residuos) que contiene un dominio de unión al DNA formado por tres dedos de zinc. Mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se demostró que una proteína de fusión entre GST y una región de PacC conteniendo los dedos de zinc se unía a cuatro sitios del promotor de *ipnA* (*ipnA*1,2,3 y 4AB) y un posterior análisis de estos sitios del promotor mediante la técnica de "footprinting" por digestión con DNasa1 permitió identificar el hexanucleótido 5'-GCCARG-3' como la secuencia consenso de unión al DNA de PacC (Tilburn *et al.*, 1995). Espeso y Peñalva (1996) mostraron que tres sitios de unión a PacC en el promotor de *ipnA* son suficientes y necesarios para la activación de la expresión de *ipnA* en respuesta a un pH ambiental alcalino. Estos resultados demostraban que PacC es un factor de transcripción que activa directamente la expresión de al menos un gen estructural (*ipnA*) en respuesta a un pH ambiental alcalino.

La proteína PacC (Tilburn *et al.*, 1995; Fig. 5), al igual que otros factores de transcripción, es rica en dominios S/TPXX (Suzuki, 1989) conteniendo 11 dominios SPXX y cuatro dominios TPXX. El extremo amino terminal de la proteína es rico en residuos de alanina (22 de los primeros 73 residuos de la proteína son alaninas). Este tipo de regiones es frecuente

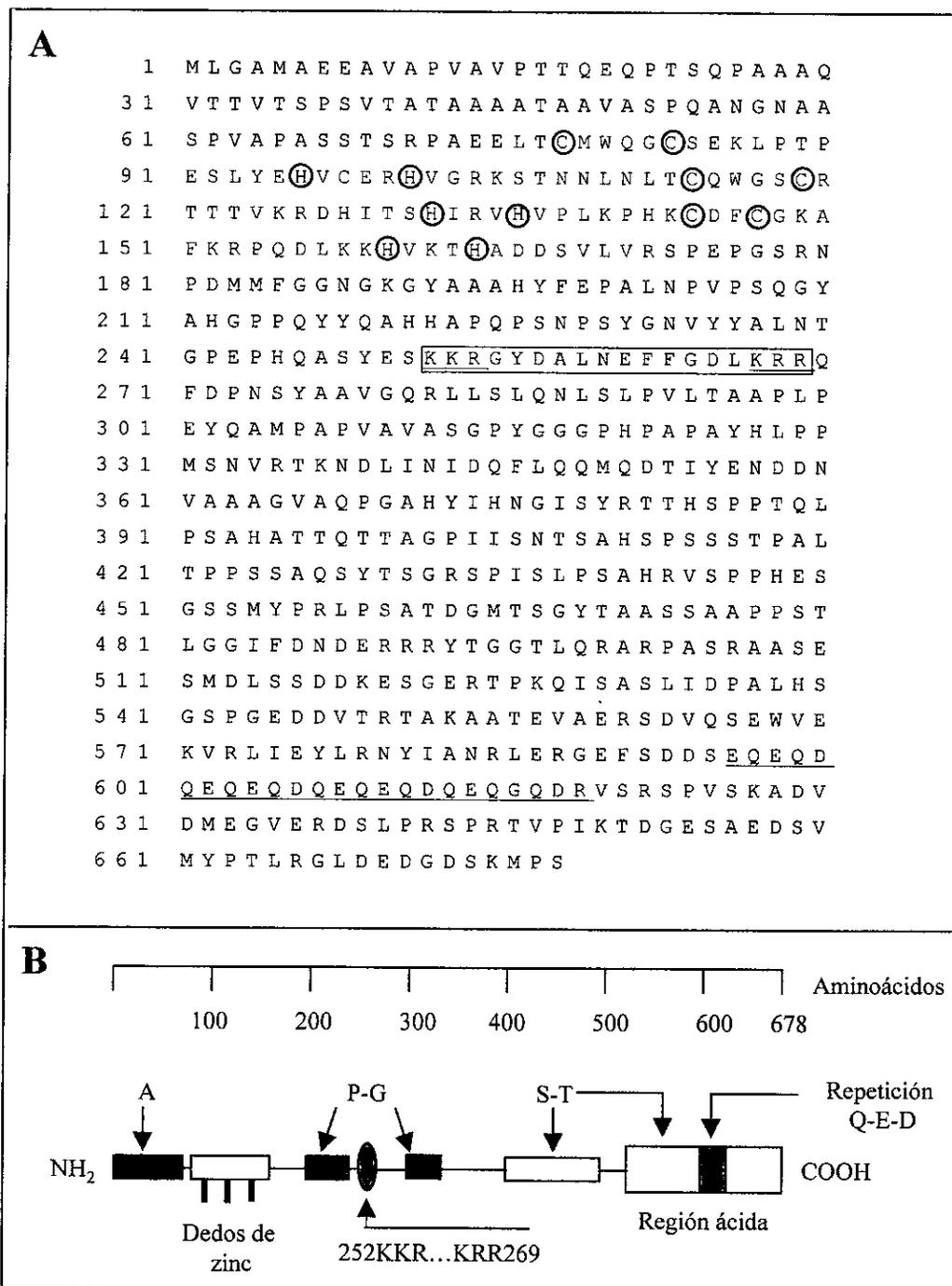


Figura 5. Secuencia de aminoácidos y esquema de la proteína PacC. (A) Secuencia de aminoácidos de PacC. En rojo se muestra la región de los dedos de zinc, con los residuos responsables de la quelación del metal rodeados por circunferencias. En azul se muestra una posible señal de localización nuclear de tipo bipartito (las dos agrupaciones de residuos básicos de esta posible señal están subrayadas). Las cuatro repeticiones (tres de ellas perfectas y una imperfecta) del hexapéptido EQEQDQ están también subrayadas. (B) Esquema de la proteína PacC en la que se indican las características de la proteína mencionadas en el texto.

en dominios represores de la transcripción (Han y Manley, 1993; Licht *et al.*, 1994, Tzmarias y Struhl, 1994). La parte central de PacC contiene dos regiones ricas en residuos de tirosina, dos regiones ricas en residuos de prolina y glicina y, cerca del extremo carboxilo terminal, dos regiones ricas en residuos de serina y treonina. La región carboxilo terminal de PacC es rica en residuos ácidos y contiene, entre los residuos 596 y 619, tres repeticiones perfectas y una imperfecta de un hexapéptido formado casi exclusivamente por glutaminas y aminoácidos ácidos. Si bien las regiones ácidas son muy comunes en dominios activadores de la transcripción (revisado por Tjian y Maniatis, 1994), el análisis mutacional (*vide infra*) sugiere que esta región modula negativamente la actividad de PacC. Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la región comprendida entre los aminoácidos 252 y 269 (KKR...KRR) (región que se ajusta a la secuencia consenso de una señal de localización nuclear de tipo bipartito (revisado por Boulikas, 1994; Jans y Hübner, 1996)) no es una señal de localización nuclear (Secciones 2.3.1 y 2.3.2 de resultados).

Los dedos de zinc de PacC (Fig. 6A), comprendidos entre los residuos 76 y 165, son del tipo Cys₂ His₂ (Klug y Rhodes, 1987). Este tipo de dedos de zinc constituye un motivo de unión al DNA muy frecuente en los factores de transcripción eucariotas y su forma de unión al DNA ha sido estudiada en detalle (revisado por Berg y Shi, 1996; ver referencias en Espeso *et al.*, 1997; Fig. 6B). La secuencia del primero de los tres dedos de zinc de PacC, similar a la del primero de los tres dedos de zinc de GLI (Pavletich y Pabo, 1993), es muy poco usual y, al igual que en el caso de GLI, este dedo no participa en los contactos con el DNA, pero su interacción con el dedo "dos" es necesaria para la interacción de los dedos "dos" y "tres" con el DNA (Espeso *et al.*, 1997). Los dedos de zinc de Rim1p, un regulador positivo de la meiosis y del crecimiento invasivo en *Saccharomyces cerevisiae* (Su y Mitchel, 1993) que probablemente media también la regulación por pH ambiental (Futai *et al.*, 1999) son muy similares a los dedos de zinc de PacC (Fig. 6A). Al alinear las secuencias de los dedos de zinc de ambas proteínas, 55 de los 97 residuos alineados son idénticos y 8 están conservados. Tanto los residuos responsables de la quelación del zinc como los extremos carboxilo terminales de los tres dedos y de las regiones que los separan ("linkers") están muy conservados. Esta conservación incluye los residuos poco usuales del primero de los dedos de zinc. Al igual que en PacC, el extremo carboxilo terminal de Rim1p es rico en residuos ácidos, y ambas proteínas tienen un tamaño similar (Rim1p es un polipéptido de 628 residuos). Fuera del dominio de unión al DNA la secuencia de PacC no presenta niveles de identidad significativos con ninguna otra proteína.

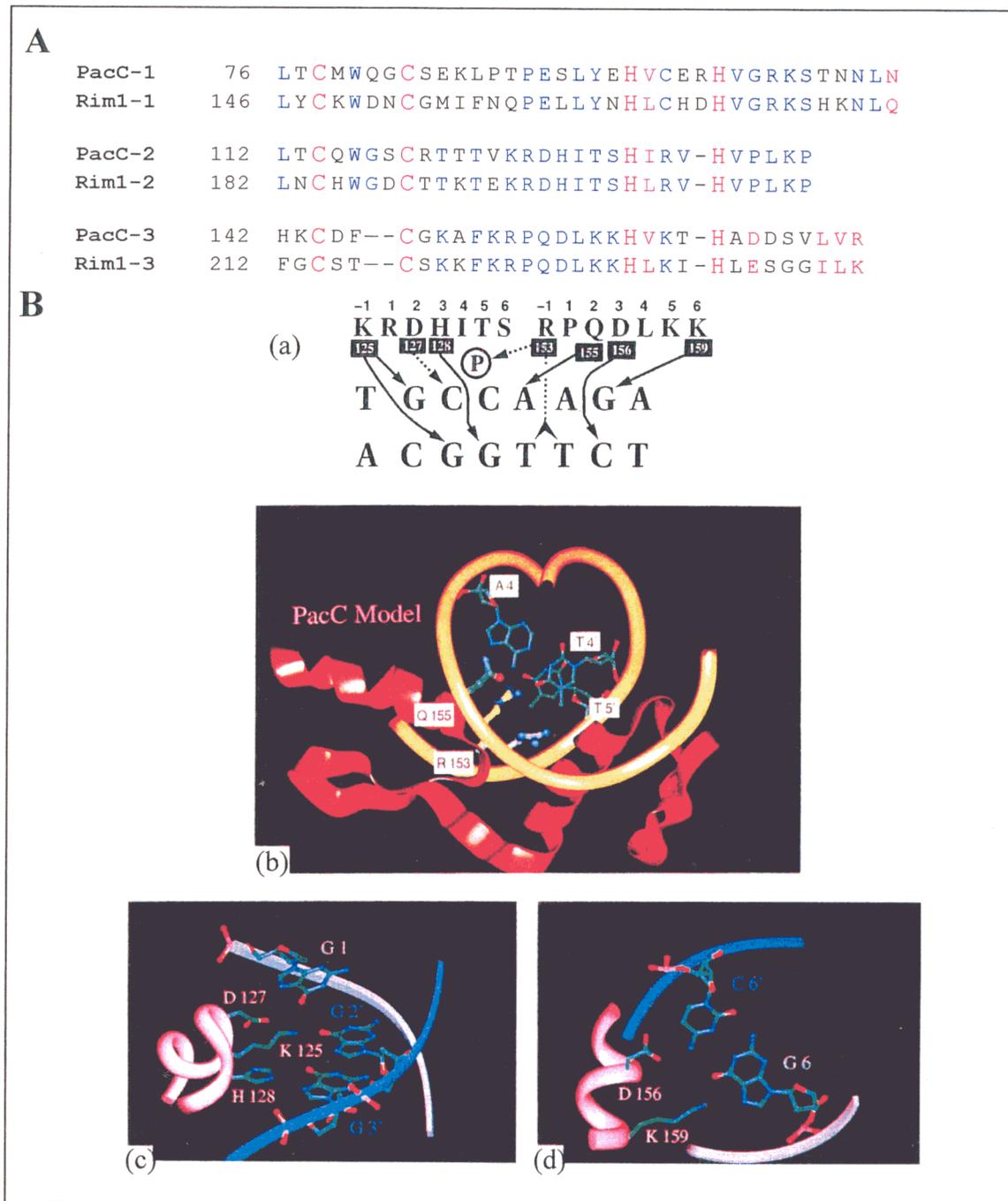


Figura 6. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la región que contiene los dedos de zinc en PacC y en el factor de transcripción Rim1p de *S. cerevisiae* (A) y modelo de unión de PacC al sitio ipnA2 (B). (A) Se muestran los residuos responsables de la quelación del zinc (rojo) y los residuos conservados (azul) o similares (púrpura), en ambas secuencias. (B) En (a) se muestra una representación esquemática de los contactos específicos de los dedos 2 y 3 con las bases del DNA (ver una descripción detallada en Espeso *et al.*, (1997)). (b) Modelado molecular de las interacciones de los dedos 2 y 3 (en rojo) con el DNA (se muestra en naranja el esqueleto de fosfatos) en el que se indican los contactos predichos para las posiciones +2 (Gln155) y -1 (Arg153) del dedo 3. (c) Modelado molecular de los contactos predichos para el dedo 2. (d) Modelado molecular de los contactos predichos para los residuos Asp156 y Lys159 del dedo 3 con los nucleótidos G6 y C6.' ((B): Tomado de Espeso *et al.*, 1997).

2.4 El gen *pacC* y el modelo molecular de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans*.

Las mutaciones *pacC*[°] son mutaciones que mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino (*vide supra*). La mayor parte de estas mutaciones (Fig. 7) resultan en truncamientos de la región carboxilo terminal de PacC comprendidos entre 100 (mutación *pacC*[°]200) y 412 residuos (mutación *pacC*[°]50). Las mutaciones *pacC*^{+/-} son mutaciones que mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido (*vide supra*) y, mayoritariamente, resultan en la eliminación de un número mayor de residuos de la región carboxilo terminal de PacC (Tilburn *et al.*, 1995; Fig. 7)). Este hecho sugería que las mutaciones *pacC*[°] son mutaciones de ganancia de función y que la región carboxilo terminal de PacC debe modular negativamente su actividad, de forma que si bien la delección de esta región (mutaciones *pacC*[°]) resulta en una proteína capaz de activar la expresión de genes “alcalinos” y prevenir la expresión de genes “ácidos”, delecciones mayores (mutaciones *pacC*^{+/-}) implican la pérdida de algunas regiones funcionales implicadas directamente en la regulación transcripcional (Tilburn *et al.*, 1995).

El análisis de PacC en una estirpe silvestre de *A. nidulans* así como en estirpes con distintas mutaciones en *pacC* o mutaciones de pérdida de función en distintos genes *pal*, proporcionó las claves para el establecimiento de un modelo molecular de la regulación por pH en este microorganismo. Utilizando las técnicas de *western* y EMSA se identificaron dos formas de PacC en extractos proteicos de *A. nidulans*, ambas capaces de unirse al sitio ipnA2 (Orejas *et al.*, 1995). Una de las formas de PacC, correspondiente al producto primario de traducción, predomina en condiciones de cultivo ácidas o en estirpes con mutaciones en cualquiera de los genes *pal*, mientras que la otra forma de PacC, que carece de aproximadamente el 60% de los residuos a partir del extremo carboxilo terminal de la proteína, predomina en condiciones de cultivo alcalinas o en estirpes con mutaciones *pacC*[°] y aparentemente se obtiene a expensas del producto primario de traducción. En estirpes con una mutación *pacC*[°] y una mutación en alguno de los genes *pal*, la forma truncada de PacC es predominante, de forma que a nivel molecular las mutaciones *pacC*[°] también son epistáticas sobre las mutaciones en los genes *pal* (Orejas *et al.*, 1995).

Los resultados del análisis molecular de PacC permitieron proponer un modelo molecular de la regulación por pH ambiental de la expresión génica en *A. nidulans* (Orejas *et al.*, 1995; Fig. 8). Según el modelo, a pH ácido PacC se mantiene en una conformación inactiva mediante interacciones intramoleculares en las que participa la región carboxilo terminal de la proteína. A un pH ambiental alcalino, y como consecuencia de la transducción de una señal mediada por los productos codificados por los genes *palA*, *-B*, *-C*, *-F*, *-H* e *I*, las interacciones moleculares se desestabilizan y PacC pasa de una conformación “cerrada” a una conformación “abierta” que permite su procesamiento proteolítico mediante la eliminación de aproximadamente el 60% de los residuos a partir del extremo carboxilo terminal de la proteína.

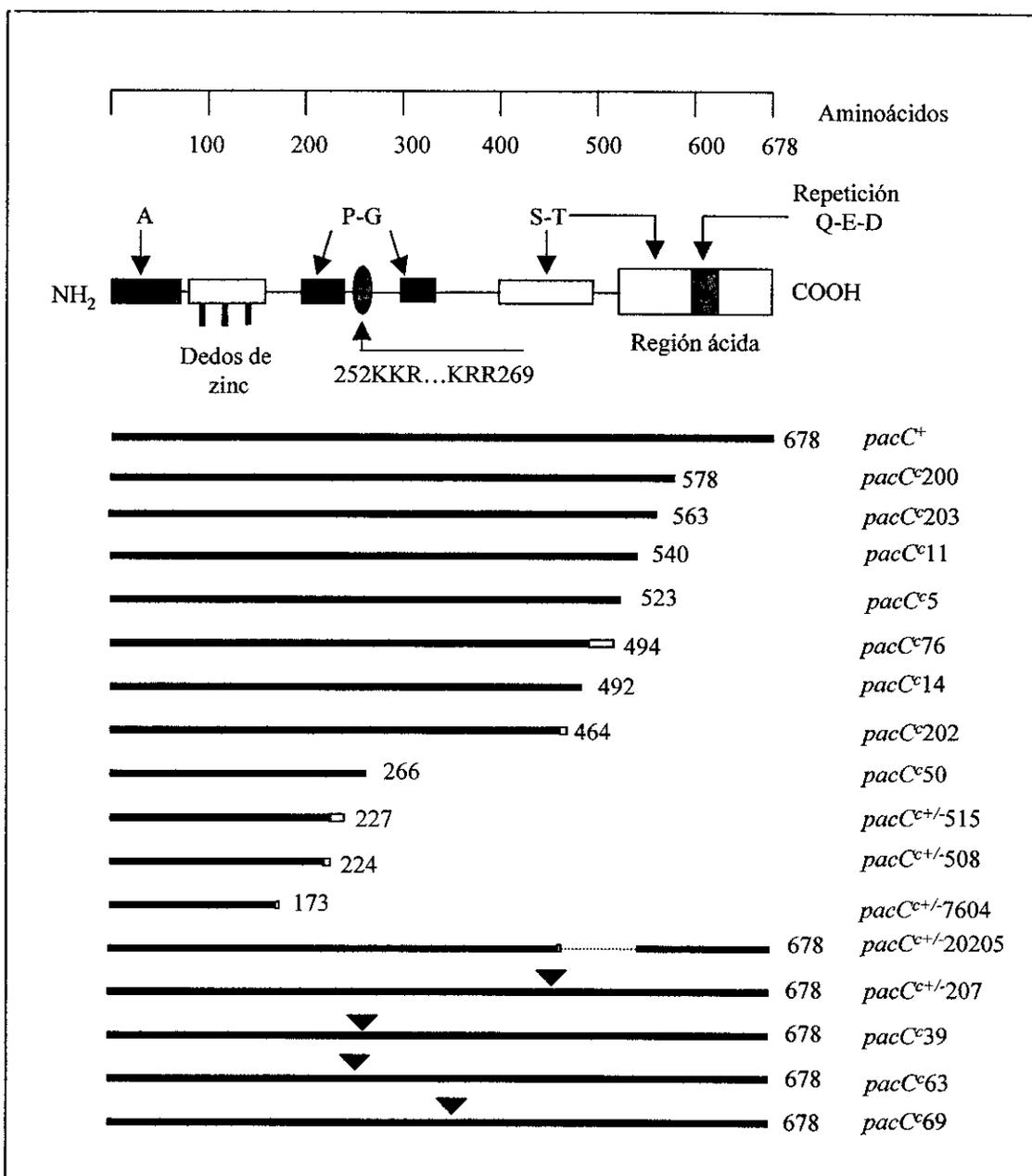


Figura 7. Esquema de la proteína PacC mostrando algunas de las características mencionadas en el texto y los productos primarios de traducción predichos para algunos alelos mutantes (Tilburn *et al.*, 1995; esta tesis). Las barras negras indican la secuencia de PacC codificada por los distintos alelos y las barras blancas la longitud aproximada de secuencias de otra fase de lectura. Al final de las barras se muestra el número del residuo carboxilo terminal de la secuencia normal de PacC. Los triángulos indican sustituciones de un único aminoácido y la línea de puntos indica la región de PacC deletcionada en la proteína codificada por *pacC*^{c+/}-20205.

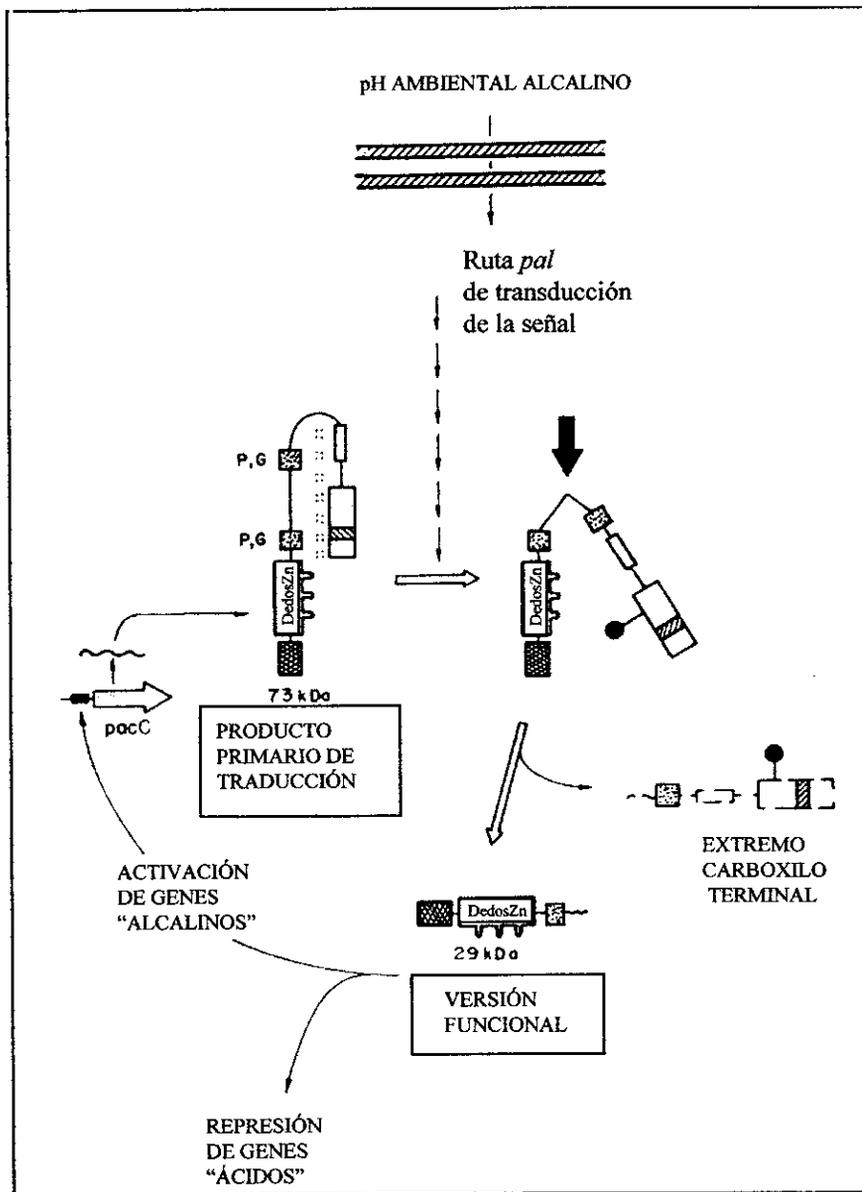


Figura 8. Modelo molecular de la regulación por pH en *A. nidulans*. El producto primario de traducción de *pacC* se mantiene en una conformación inactiva mediante interacciones intramoleculares en las que participa la región carboxilo terminal de la proteína. En respuesta a un pH ambiental alcalino, los productos codificados por los genes *pal* introducen una modificación en la proteína que permite la eliminación proteolítica de ~ el 60% de los residuos de la región carboxilo terminal. La forma procesada resultante (versión funcional) es capaz de activar la transcripción de genes "alcalinos" y prevenir la transcripción de genes "ácidos". Las mutaciones *pacC^c* previenen las interacciones intramoleculares, permitiendo el procesamiento de PacC incluso en ausencia de una ruta *pal* funcional, y resultan en un fenotipo de mimesis de alcalinidad. Mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal*, al bloquear el cambio conformacional de PacC, previenen el procesamiento proteolítico y resultan en una desrepresión constitutiva de la expresión de genes "ácidos" y en la falta de activación de la expresión de los genes "alcalinos" (fenotipo de mimesis de acidez). Tomado y modificado de Orejas *et al.*, (1995).

INTRODUCCIÓN

La forma procesada resultante es la forma funcional capaz de activar la expresión de los genes "alcalinos" y prevenir la expresión de los genes "ácidos". Las mutaciones *pacC^c*, mutaciones de ganancia de función que resultan en independencia de la señal *pal* (*vide supra*), previenen las interacciones intramoleculares, permitiendo el procesamiento de PacC incluso en ausencia de una ruta *pal* funcional, y por tanto resultan en niveles elevados de la forma activa de PacC a cualquier pH ambiental y, en consecuencia, en niveles elevados de la expresión de los genes "alcalinos" y en niveles reducidos de la expresión de los genes "ácidos". Mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal* bloquearían el cambio conformacional de PacC (estaría permanentemente en su conformación "cerrada") y, al igual que una mutación nula de *pacC*, resultarían en una desrepresión de la expresión de genes "ácidos" y en la falta de activación de la expresión de los genes "alcalinos". El hecho de que los niveles de transcripción de *pacC* sean elevados en estirpes con mutaciones *pacC^c* y bajos en estirpes con mutaciones en genes *pal*, sugería que *pacC* es un gen alcalino y que por tanto podría regular positivamente su propia expresión (Tilburn *et al.*, 1995).

Recientemente se han caracterizado tres mutaciones que mimetizan crecimiento a pH alcalino, *pacC^c39*, *pacC^c63* y *pacC^c69*, que no resultan en truncamientos del extremo carboxilo terminal de PacC, sino en los cambios L266F, L259R y L340S, respectivamente, que podrían favorecer el acceso de la proteasa procesativa a PacC, y dos mutaciones de pérdida de función, *pacC^{+/+}207* y *pacC^{+/+}20205*, que podrían afectar negativamente a la recepción de la señal de pH ambiental alcalino o a las consecuencias a nivel conformacional resultantes de la recepción de esta señal (esta tesis). Finalmente se ha caracterizado un tercer tipo de mutaciones, denominadas "neutrality-mimicking" (mutaciones *pacC^{c/+}*) que resultan en fenotipos con características comunes tanto del fenotipo de las mutaciones *pacC^c* como del de las mutaciones *pacC^{+/+}* (Mingot *et al.*, 1999).

Rim1p, al igual que PacC, se activa mediante la eliminación proteolítica del extremo carboxilo terminal de la proteína. Este procesamiento, que está favorecido en condiciones alcalinas de cultivo, requiere la función de al menos los genes *RIM9*, 8 y 13 (Li y Mitchel, 1997). La similitud de los dedos de zinc de ambas proteínas y el hecho de que estos dos factores de transcripción se activen de forma similar en respuesta a un pH ambiental alcalino sugería que las proteínas codificadas por los genes *RIM9*, 8 y 13 podían ser homólogas de las proteínas codificadas por algunos de los genes *pal* de *A. nidulans* (Li y Mitchel, 1997). Denison *et al.* (1998) mostraron que los productos codificados por los genes *pall* y *RIM9* son homólogos y recientemente se ha mostrado que la proteína codificada por el gen *CPL1* de *S. cerevisiae*, homóloga de PalB, puede estar implicada en el procesamiento y/o la estabilidad de Rim1p (Futai *et al.*, 1999).

2.5 Los genes *pal*.

Con objeto de estudiar el mecanismo de transducción de la señal de pH ambiental alcalino, paralelamente a la caracterización de PacC se han clonado los 6 genes *pal* (A, B, C, F, H e I) y actualmente se está procediendo a su caracterización molecular. Si bien el análisis de secuencia no ha permitido establecer su posible función en la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino, todos los productos génicos codificados por los genes *pal*, a excepción de *palC*, tienen posibles homólogos en *S. cerevisiae* y algunos, como *palA*, en otros organismos como *Caenorhabditis elegans* y *Schizosaccharomyces pombe* (se indican los números de acceso de las secuencias de los posibles homólogos de los genes *pal* en la base de datos "genbank" del NCBI (National Center for Biotechnology Information)). Así, se han encontrado posibles homólogos en *S. cerevisiae* de los productos de los genes *palA*, - *F*, y *H* y se ha demostrado que las proteínas Rim9p y Cpl1p, ambas necesarias para la activación de Rim1p, son homólogas de las proteínas codificadas por *palI* y *palB*, respectivamente (*vide infra*). Estos resultados sugieren que si bien los factores de transcripción PacC y Rim1p han podido divergir en sus funciones reguladoras y en las señales a las que responden, probablemente hayan mantenido una misma ruta de transducción de la señal, que igualmente pudiera estar presente en organismos eucariotas superiores.

El gen *palC* (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999) es el único de los 6 genes *pal* que no tiene un posible homólogo en *S. cerevisiae*, lo que sugiere que la ruta de transducción de la correspondiente señal en *S. cerevisiae* carece del correspondiente homólogo o bien que el análisis de secuencia es ineficaz para poder identificarlo. Solamente la caracterización completa de la ruta de transducción de la correspondiente señal en *S. cerevisiae* revelará si existe o no un homólogo de *palC*. *palC* codifica una proteína de 507 residuos (PalC) y solamente tiene una identidad significativa (63%) con una secuencia de 73 aminoácidos (codificada por una EST) de una hipotética proteína de *Neurospora crassa*.

palF (Maccheroni *et al.*, 1997) codifica una proteína de 775 residuos (PalF) que tiene una identidad del 30% y del 27% con dos hipotéticas proteínas de *S. cerevisiae* (n^{os} de acceso Z72567 y Z72568, respectivamente).

palH (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999) codifica una proteína de 760 residuos (PalH) en cuya región amino terminal contiene 7 posibles dominios transmembrana, lo que sugiere que podría ser una proteína de membrana. En la región de los supuestos dominios transmembrana PalH tiene una identidad del 29,3% con una hipotética proteína de membrana de *S. cerevisiae* (n^o de acceso NO466 (Maurer *et al.*, 1995)).

El gen *palA* (Negrete-Urtasun *et al.*, 1997) codifica una proteína de 798 residuos (PalA) con una identidad del 30%, 29,4% y 23% con hipotéticas proteínas de *S. cerevisiae* (n^o de acceso Z75183), *Caenorhabditis elegans* (n^o de acceso Z29561) y *Schizosaccharomyces*

pombe (nº de acceso Z54354), respectivamente, y una identidad del 20,8% con la proteína Bro1p de *S. cerevisiae*. Bro1p interacciona con una ruta de señalización de tipo MAP quinasa (proteína quinasa activada por mitógeno) activada por la proteína quinasa C (PKC) necesaria para la integridad celular (Nickas y Yaffe, 1996). Al igual que Bro1p, PalA tiene posibles dominios SH3 y una región rica en prolinas en el extremo carboxilo terminal que sugiere que podría interaccionar con proteínas con este tipo de dominios (SH3).

El gen *palB* (Denison *et al.*, 1995) codifica una proteína de 842 residuos (PalB) homóloga de la proteína codificada por el gen *CPL1* de *S. cerevisiae* (Futai *et al.*, 1999). Las proteínas PalB y Cpl1p contienen una región con una elevada identidad con el dominio catalítico de las calpaínas, cisteín-proteasas dependientes de calcio (revisado por Sorimachi *et al.*, 1997), pero carecen de las secuencias necesarias para la unión del calcio y su regulación. Ambas proteínas tienen una identidad del 23,6% (similitud del 64,6%) en el dominio catalítico, conservan los residuos Cys, His y Asn de la triada catalítica de las calpaínas y tienen una identidad del 21,2% (similitud del 60,3%) en un dominio de 30 kDa adyacente al dominio catalítico. La presencia del dominio catalítico y la ausencia de los dominios reguladores y de unión al calcio sugiere que estas proteínas pudieran ser proteasas con la misma especificidad de sustrato que las calpaínas pero no estar reguladas por calcio. Al igual que las mutaciones de pérdida de función en *palB*, las mutaciones de pérdida de función en *CPL1* resultan en la ausencia de crecimiento a pH alcalino. Cpl1p parece estar implicada en la estabilidad de Rim1p (Futai *et al.*, 1999) y se ha demostrado que PalB no es la proteasa procesativa de PacC (Denison *et al.*, 1995).

El gen *pall* (Denison *et al.*, 1998) codifica una proteína de 601 residuos (Pall) con cuatro posibles dominios transmembrana en su región amino terminal que es homóloga a la de la proteína codificada por el gen *RIM9* de *S. cerevisiae*. La región de Pall que contiene estos dominios tiene una identidad del 36,7% con la proteína Rim9p de *S. cerevisiae*, mientras que la región carboxilo terminal de la proteína no tiene una identidad significativa con ninguna otra proteína. Los hechos de que, al igual que se ha sugerido para Rim9p (Li y Mitchell, 1997), Pall pueda ser una proteína de membrana (Denison *et al.*, 1998) y de que las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los otros genes *pal* sean epistáticas sobre las mutaciones de pérdida de función en *pall* (Arst *et al.*, 1994) (lo que sería congruente con que *pall* pudiera desempeñar una función anterior a la del resto de los otros genes *pal*), favorecerían la hipótesis de que Pall pueda ser el receptor de la señal de pH ambiental alcalino (Denison *et al.*, 1998).

2.6 Los genes *pacM* y *pacX*.

Recientemente se han identificado los genes *pacM* (Sarkar *et al.*, 1996) y *pacX* (Elaine Bignell, comunicación personal) que podrían formar parte del sistema regulador por pH de *A. nidulans*. Las mutaciones en *pacM* suprimen las características fenotípicas de las mutaciones *pacC^c* de la falta de expresión de genes "ácidos" sin afectar la expresión de los genes "alcalinos", por lo que se ha sugerido que *pacM* podría ser necesario para la función represora de la transcripción de genes ácidos mediada por *pacC* (Sarkar *et al.* 1996). Se ha propuesto que *pacM* podría codificar un factor de transcripción responsable de la represión directa de los genes ácidos, cuya expresión estaría regulada positivamente por PacC, o un cofactor necesario para que PacC pudiera reprimir la expresión de los genes ácidos (Sarkar *et al.*, 1996).

La mutación *pacX1* suprime las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal* así como algunas mutaciones de pérdida de función en *pacC* (Elaine Bignell, comunicación personal). Estudios preliminares de los efectos moleculares de la mutación *pacX1* muestran como tanto en un fondo genético *pacC⁺*, como en fondos genéticos *pacC^{+/-}* o *pal*, esta mutación resulta en niveles elevados de PacC.

2.7 Homólogos de *pacC*.

La caracterización genética y molecular de *pacC* en *A. nidulans* ha permitido clonar los homólogos de este gen en *P. chrysogenum* (Suárez y Peñalva, 1996) y en *A. niger* (MacCabe *et al.*, 1996). El gen *pacC* de *P. chrysogenum* codifica una proteína de 641 residuos con una identidad del 64% con la proteína de *A. nidulans* y el gen *pacC* de *A. niger* codifica una proteína de 677 residuos con una identidad del 65% con la de *A. nidulans*. Ambas proteínas contienen las mismas características de secuencia que las descritas para la proteína de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995; *vide supra*) incluyendo los tres dedos de zinc del tipo Cys2 Hys2. A excepción de la secuencia de las regiones amino y carboxilo terminales, el resto de la secuencia aminoacídica está muy conservado entre las tres especies (Fig. 9). Al igual que en *A. nidulans* los niveles de transcripción de *pacC* en *P. chrysogenum* y en *A. niger* son altos en condiciones de cultivo alcalinas y bajos en condiciones de cultivo ácidas. En *P. chrysogenum*, al igual que en *A. nidulans*, el aumento de la producción de penicilina al aumentar el pH del medio de cultivo se corresponde con el aumento de los niveles de transcrito de *pcbC* (gen que codifica la isopenicilina N sintetasa de *P. chrysogenum*) y PacC se une a distintos sitios del promotor de este gen, y reconoce una secuencia consenso idéntica a la reconocida por la proteína PacC de *A. nidulans*, resultados que sugieren que en *P. chrysogenum*, al igual que en

A. nidulans (Espeso y Peñalva., 1996), *pacC* regula directamente la expresión de *pcbC* (Suárez y Peñalva, 1996). En *A. niger* se ha demostrado que tanto la expresión de dos proteasas extracelulares ácidas (Jarai y Buxton 1994) como la de tres fosfatasas ácidas (van den Hombergh *et al.*, 1996) está regulada por el pH ambiental y que en el caso de las fosfatasas esta regulación está mediada por *pacC* (van den Hombergh *et al.*, 1996).

YLRIM101 (Lambert *et al.*, 1997) es el homólogo de *pacC* en *Yarrowia lipolytica*. Este gen codifica una proteína de 585 residuos (YLRIM101p) con una identidad del 27,6% y del 34,6% con Rim1p y PacC, respectivamente, que contiene tres dedos de zinc de tipo Cys2His2 muy semejantes a nivel de secuencia aminoacídica a los de Rim1p y PacC. Al igual que *RIM1*, *YLRIM101* parece regular la entrada en meiosis y al igual que *pacC* la expresión génica en respuesta al pH ambiental. Los genes *YLRIM101* y *PAL1*, 2, 3 y 4 son necesarios para la expresión de *XPR2* (gen que codifica una proteasa alcalina (Davidov *et al.*, 1987)) en *Y. lipolytica*. Mutaciones en cualquiera de los genes *PAL* previenen tanto la expresión de *XPR2* como la entrada en meiosis. Versiones truncadas de YLRIM101p suprimen las mutaciones en cualquiera de los genes *PAL* y permiten una expresión elevada de *XPR2* a cualquier pH ambiental. Lambert *et al.* (1997) propusieron un modelo de activación proteolítica de YLRIM1p en respuesta a un pH ambiental alcalino en el que los genes *PAL*, posibles homólogos de los genes *pal* de *A. nidulans*, serían necesarios para la transducción de la señal activadora de este factor de transcripción.

Recientemente se han identificado dos supuestos genes de *Candida albicans*, *HRM101* y *ENX3*, que podrían ser homólogos de *pacC* y *palA*, respectivamente (Wilson *et al.*, 1999). El hecho de que la disrupción de cada uno de estos genes resulte en un mismo fenotipo (indicando que ambos genes podían estar implicados en una misma ruta) y de que el fenotipo resultante (ausencia de filamentación) sea equivalente al fenotipo resultante de mutaciones de pérdida de función en el gen *RIM1* de *S. cerevisiae* (posible homólogo de *pacC*) refuerza esta hipótesis (Wilson *et al.*, 1999).

3 ACTIVACIÓN POR PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

La actividad de muchos factores de transcripción está modulada negativamente mediante su interacción con dominios proteicos en "trans" (proteínas que interaccionan con el factor de transcripción) o en "cis" (un dominio del propio factor de transcripción). Estos dominios pueden prevenir la unión del factor de transcripción al DNA, su dimerización (en caso de que ésta sea necesaria para su actividad), su función transactivadora o, en células eucariotas, su localización nuclear. En todos los casos, la activación del factor de transcripción

implica la eliminación proteolítica de los dominios que modulan su actividad. Este mecanismo de activación, irreversible, plantea el problema de cómo inactivar el factor de transcripción una vez que cesa la señal activadora (ver sección 3 de resultados y discusión).

3.1 Factores de transcripción regulados por procesamiento proteolítico, que son modulados negativamente en “trans”.

Un ejemplo de un factor de transcripción cuya actividad está modulada negativamente por otra proteína es el factor NF- κ B, que en humanos regula la expresión de genes necesarios para las respuestas inmune e inflamatoria (revisado por Ghos *et al.*, 1998) y la proteína Dorsal, el homólogo de NF- κ B en *Drosophila melanogaster*. NF- κ B es un heterodímero que puede estar formado por distintas proteínas de la familia Rel (Grilli *et al.* 1993; Kopp y Ghos, 1995; Verma *et al.*, 1995; Thanos y Maniatis, 1995) entre las que se encuentran RelB, c-Rel, p65, p100/p52 y p105/p50. La primera molécula NF- κ B descrita era un heterodímero formado por las proteínas p50 y p65 (Kopp y Ghos, 1995; Verma *et al.*, 1995), por lo que este dímero es el que se conoce normalmente por NF- κ B. Las proteínas de la familia Rel se caracterizan por tener una región amino terminal de 300 residuos muy conservada conocida como el dominio de homología Rel (RHD), que contiene una señal de localización nuclear (NLS) y dominios de unión al DNA, de dimerización con otras proteínas Rel y de unión a proteínas I κ B (Ghos *et al.*, 1998). La familia de las proteínas I κ B comprende las proteínas I κ B α , β , ϵ y γ . Estas proteínas, de las cuales I κ B α y β son las más importantes, modulan negativamente la actividad de NF- κ B. Cada una de estas proteínas contiene en su extremo carboxilo terminal varias repeticiones de una región de 33 aminoácidos, denominada motivo de anquirina, que constituyen su dominio de unión a las proteínas Rel. Estas proteínas se unen a NF- κ B y enmascaran su NLS, con lo que retienen NF- κ B en el citoplasma y previenen, por tanto, su actividad (Verma *et al.*, 1995; Baldwin, 1996). En respuesta a distintos estímulos indicativos de estrés o de infección vírica o bacteriana, I κ B se degrada proteolíticamente y NF- κ B se transloca al núcleo y regula la expresión de genes bajo su control (revisado por Verma *et al.*, 1995; Baeurle y Baltimore, 1996). En el caso de I κ B α la estimulación celular con inductores de NF- κ B resulta en la fosforilación de esta proteína inhibidora bien en residuos de Tyr, bien en los residuos Ser32 y Ser36 (Fig. 10). En el primer caso, el menos habitual, I κ B α se separa sin ser degradado (Imbert *et al.*, 1996) mientras que en el segundo caso, el más habitual, a la fosforilación de los residuos Ser32 y Ser36 (Brockman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995; Whitside *et al.*, 1995) le sigue la posterior ubiquitinación de los residuos Lys21 y Lys22 (Chen *et al.*, 1995; Scherer, 1995) y finalmente la degradación proteolítica de I κ B α por el proteosoma.

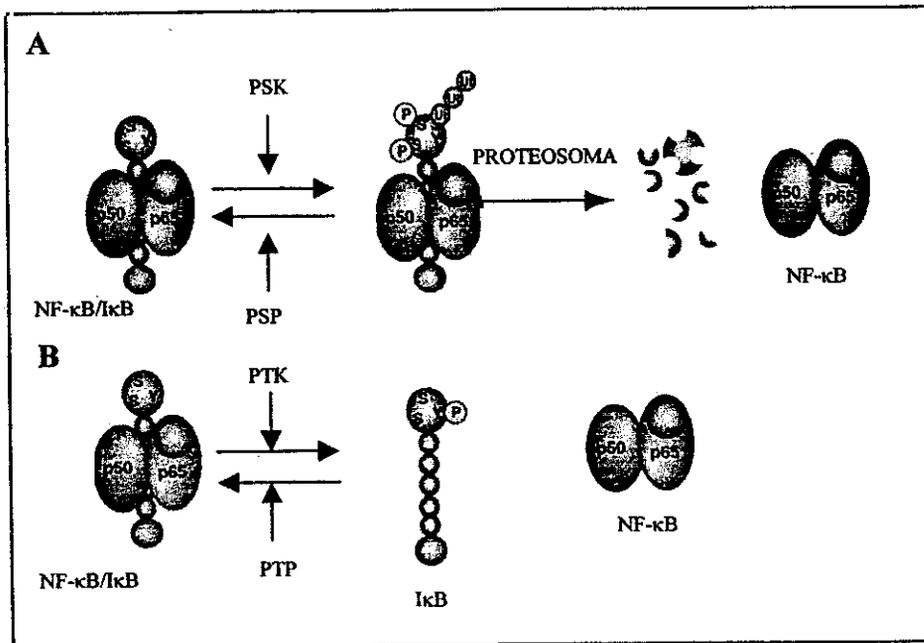


Figura 10. Modelo de activación de NF- κ B. (A) Activación de NF- κ B mediante degradación proteolítica de I κ B- α . PSK, proteína-quinasa de residuos de serina; PSP, proteína-fosfatasa de residuos de serina; Ub, ubiquitina; SS serinas 32 y 36. (B) Activación de NF- κ B mediante fosforilación de residuos de tirosina de I κ B- α . PTK, proteína-quinasa de residuos de tirosina; PTP, proteína-fosfatasa de residuos de tirosina; Y, tirosina 42. (Tomado de Imbert *et al.*, 1996).

En este último caso, ni la fosforilación ni la ubiquitinación por sí solas son suficientes para la separación de I κ B α de NF- κ B lo que indica que el factor de transcripción sólo se libera tras la degradación de I κ B α .

El homólogo de NF- κ B en *Drosophila melanogaster*, Dorsal, es necesario para establecer la polaridad dorso-ventral (Anderson y Nüsslein-Volhard, 1986; Morisato y Anderson, 1995) así como para la respuesta inmunitaria (Ip y Levine, 1994; Hoffman, 1995) y el desarrollo muscular (Nose *et al.*, 1992; Halfon *et al.*, 1995). Cactus, el homólogo de I κ B en *Drosophila*, se une mediante la región que contiene las repeticiones de anquirina al dominio Rel de un dímero de Dorsal reteniéndolo en el citoplasma (Kidd, 1992). La activación de Dorsal implica la degradación proteolítica de Cactus, inducida mediante la fosforilación de los residuos de serina 74, 78, 82 y 83 (Reach *et al.*, 1996), y la fosforilación de determinados residuos de Dorsal, siendo necesarios ambos procesos para que Dorsal pueda ser translocado al núcleo (Bergman *et al.*, 1996).

3.2 Factores de transcripción regulados por procesamiento proteolítico que son modulados negativamente en "cis".

Entre los factores de transcripción que se activan mediante la eliminación proteolítica de dominios en "cis" que modulan negativamente su actividad se incluyen la proteína p105 (precursora de la proteína p50, una de las proteínas Rel que pueden formar parte de NF- κ B), las proteínas de unión a los elementos que median la regulación por esteroides (SREBPs), el factor de transcripción *Cubitus interruptus* y PacC (ver sección 2.3 de esta introducción).

El gen *NFKB1* codifica dos proteínas Rel funcionales distintas denominadas p50 y p105. p50 constituye la región amino terminal del producto primario de traducción, p105, y hasta hace poco se consideraba que esta proteína se obtenía mediante el procesamiento proteolítico de p105, (Ghos *et al.*, 1990; Kieran *et al.*, 1990; Palombella *et al.*, 1994). La región carboxilo terminal de la proteína p105, que contiene varias repeticiones del dominio de anquirina, es homóloga a las proteínas I κ B y puede comportarse como ellas, de forma que p105 puede asociarse con otras proteínas Rel, como p65, formando complejos p105-Rel que quedan retenidos en el citoplasma. El hecho de que la síntesis de p50 requiera ATP (Fan y Maniatis, 1991), sea inhibida por inhibidores del proteosoma y no tenga lugar en levaduras con mutaciones de pérdida de función en el gen *PRE1*, gen que codifica una de las subunidades del proteosoma, (Palombella *et al.*, 1994), sugiere que el proteosoma está implicado en este proceso. Asimismo, la síntesis de p50 en células COS (Lin y Ghos, 1996) requiere una región rica en glicinas (GRR) localizada entre los aminoácidos 375 y 401 de p105. Las regiones carboxilo terminales a esta secuencia pueden ser reemplazadas por polipéptidos heterólogos (Betts y Nabel, 1996) sugiriendo que estas regiones no contienen elementos de secuencia esenciales para la obtención de p50. Recientemente, Lin *et al.* (1998) han presentado evidencias de que p50 se obtiene mediante el procesamiento cotraduccional, mediado por el proteosoma, del polipéptido codificado por *NFKB1*. Según estos autores la región amino terminal del polipéptido (que contiene la proteína p50) se pliega rápidamente según se va traduciendo, mientras que la región carboxilo terminal (separada por la región (GRR)) se pliega lentamente mientras está unida al ribosoma. Si la traducción es lenta, la conformación desplegada del extremo carboxilo terminal favorece su degradación proteolítica vía proteosoma, sintetizándose p50, mientras que si la traducción es más rápida, la liberación del polipéptido completo permite su plegamiento rápido, previniéndose la degradación del extremo carboxilo terminal y sintetizándose, en consecuencia, la proteína p105 (Fig.11).

Las proteínas SREBP, proteínas de unión a elementos de regulación por esteroides (Sterol Regulatory Element Binding Protein) son factores de transcripción que, en ausencia de esteroides, activan la biosíntesis de colesterol, receptores de lipoproteínas de baja densidad y ácidos grasos (revisado por Brown y Goldstein, 1997). Los tres miembros de la familia SREBP

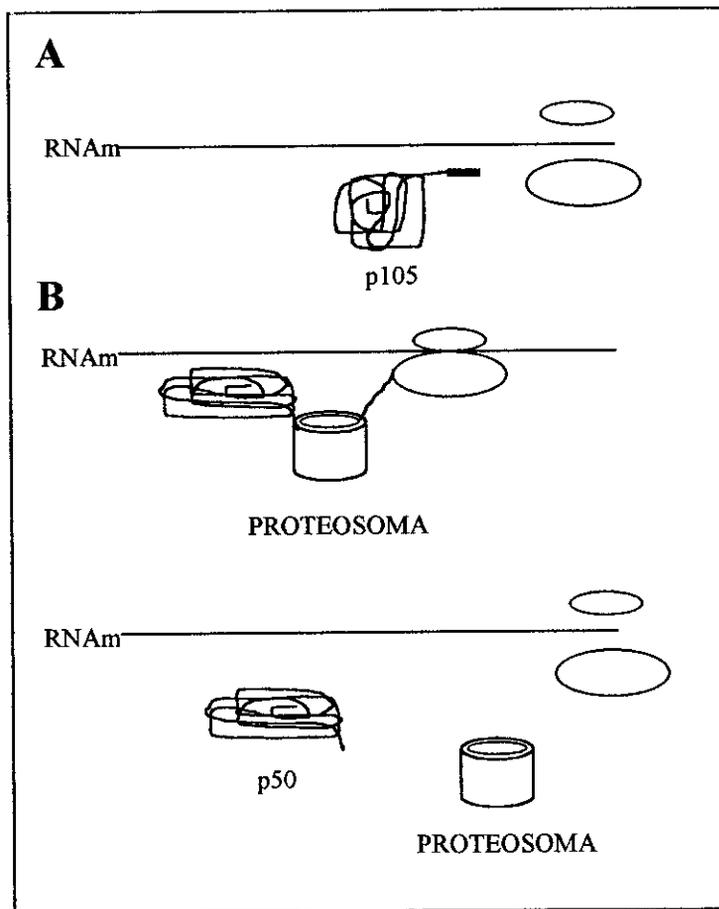


Figura 11. Modelo de biogénesis cotraduccional mediada por el proteosoma de la proteína p50 del factor de transcripción NF- κ B. (A) Traducción rápida del mRNA de *NFKB1* y síntesis de p105. (B) Traducción lenta del mRNA de *NFKB1* y obtención de p50 mediante la degradación proteolítica cotraduccional (vía proteosoma) de la mitad carboxilo terminal del polipéptido. Las elipses representan las subunidades ribosomales.

identificados (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993) tienen una estructura tripartita muy similar que comprende un dominio amino terminal (aproximadamente 480 aminoácidos) funcional como factor de transcripción; una región hidrofóbica intermedia de aproximadamente 80 aminoácidos que contiene dos regiones transmembrana hidrofóbicas separadas por una secuencia hidrofílica; y un dominio carboxilo terminal de aproximadamente 590 aminoácidos. La región amino terminal consta de una región ácida necesaria para la activación de la expresión génica mediada por este factor (Sato *et al.*, 1994) seguida de una región rica en prolina, serina, glicina y glutamina y, a continuación, un dominio del tipo básico, hélice - vuelta - hélice, cremallera de leucina (dominio bHLH-Zip) implicado en la unión del factor de transcripción al DNA. Las proteínas SREBP se localizan en la membrana del retículo

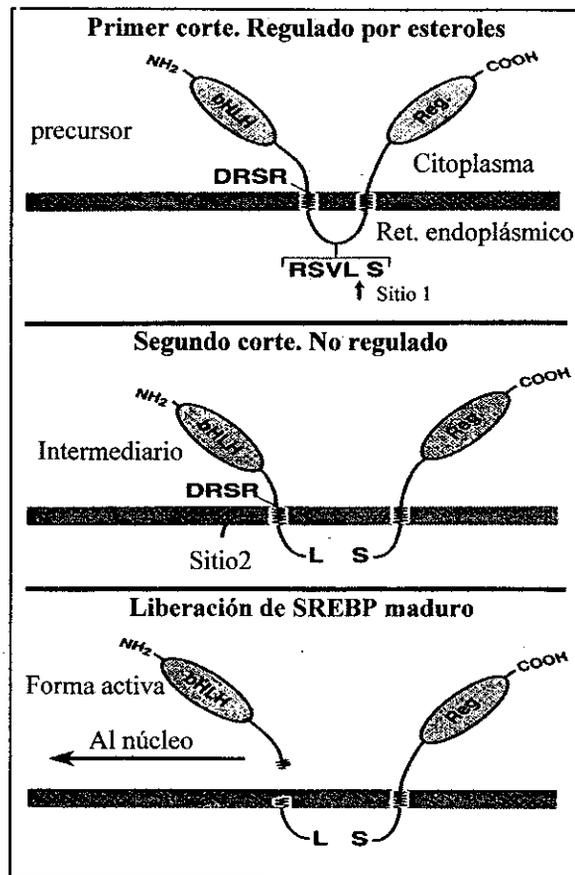


Figura 12. Modelo de la activación proteolítica de las proteínas SREBP. La activación de estos factores de transcripción (en ausencia de esteroides) tiene lugar mediante la liberación proteolítica de la región amino terminal de la proteína, que constituye la versión funcional del factor de transcripción. Esta liberación se produce mediante dos cortes proteolíticos secuenciales. El primer corte tiene lugar en la región hidrofílica que separa los dos dominios transmembrana y el segundo corte tiene lugar en el primer dominio transmembrana. El factor de transcripción liberado entra rápidamente en el núcleo pudiendo así regular la expresión de genes bajo su control. Reg., dominio regulador de SREBP; bHLH, dominio básico hélice vuelta hélice. Tomado de Brown y Goldstein (1997).

endoplásmico o del núcleo con los extremos amino y carboxilo terminales dirigidos hacia el citoplasma y la secuencia hidrofílica que separa los dos dominios transmembrana dirigida hacia el lumen del orgánulo (Hua *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1997). La activación de las proteínas SREBP requiere la liberación de la región amino terminal que contiene el factor de transcripción. Esta liberación se produce mediante dos cortes proteolíticos secuenciales (Fig. 12). El primero de estos cortes tiene lugar aproximadamente en la parte central de la región hidrofílica que separa los dos dominios transmembrana (Duncan *et al.*, 1997) y el segundo de estos cortes se produce en el primero de los dominios transmembrana (Sakai *et al.*, 1996; Fig.

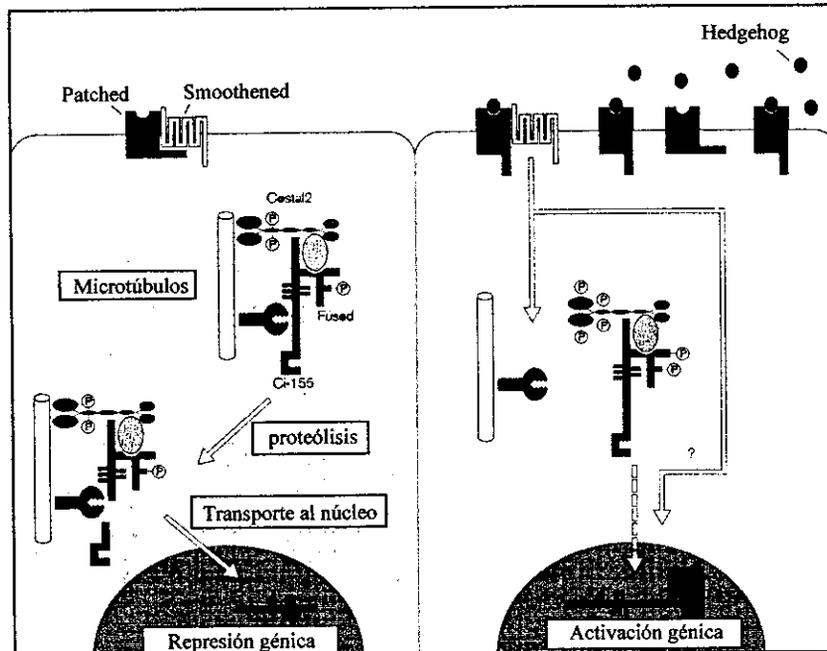


Figura 13. Modelo de la transducción de la señal Hh en el interior celular. En ausencia de Hh (izquierda) Patched (Ptc) inhibe la actividad de Smoothened (Smo); el complejo citoplásmico conteniendo Cos2, Fu, y Ci155 está asociado con los microtúbulos y Ci75, que se obtiene mediante el procesamiento proteolítico de Ci155, se localiza en el núcleo. Ci75 contiene el dominio de unión an DNA, carece del sitio de unión an coactivador CBP, y actúa como un represor transcripcional. La unión de Hh a su receptor, Ptc (derecha), da lugar a la activación de Smo, Cos2 y Fu se hiperfosforilan y el complejo citoplásmico se separa de los microtúbulos. En estas condiciones Ci155 no se procesa, se activa mediante un mecanismo desconocido y es capaz de actuar como un activador transcripcional. Tomado de Kalderon (1997).

12). El factor de transcripción liberado entra rápidamente en el núcleo pudiendo así regular la expresión de genes bajo su control. El primero de los cortes está regulado negativamente por esteroides (Wang *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1996), de forma que sólo tiene lugar en células con concentraciones bajas de estos compuestos y el segundo corte, si bien no está regulado directamente por esteroides, sólo puede tener lugar después de que se haya producido el primer corte proteolítico.

Cubitus interruptus (Ci) es el factor de transcripción que media la regulación de la expresión de genes en respuesta a la señal Hedgehog (Hh) en *Drosophila melanogaster*. (Revisado por Ruiz i Atalba, 1997; Kalderon, 1997; Ingham, 1998). El gen *hedgehog* (*hh*) codifica una proteína de secreción, Hedgehog (HH), que desempeña un papel fundamental en el establecimiento del patrón de diferenciación celular necesario para la formación de distintos apéndices durante el desarrollo de *Drosophila*. La señal Hh, que se inicia con la unión de la proteína HH a su receptor Patched (Ptc) y la activación por parte de este receptor de la proteína de membrana Smoothened (Smo), resulta finalmente en la activación de la expresión

INTRODUCCIÓN

de los genes bajo el control de esta proteína. Algunos de estos genes son específicos de un tipo celular, como es el caso de *wingless* (*wg*), que se expresa en el ectodermo ventral embrionario, o de *decapentaplegic* (*dpp*), que se expresa en los discos imaginales de las alas, mientras que otros como *pathed* (*ptc*) (que codifica el receptor de HH) se expresa en todos los tipos celulares. La única proteína capaz de unirse al DNA que genéticamente ha sido implicada en la transducción de la señal Hh es Ci, proteína que contiene cinco dedos de zinc similares a los dedos de zinc de las proteínas Gli de vertebrados. Este factor de transcripción puede actuar como un activador o (en su forma procesada) como un represor de la expresión de genes regulados por HH. En ausencia de la señal Hh, Ci forma parte de un complejo proteico formado por este factor de transcripción y las proteínas Fu, Sufu y Cos2, que se mantiene unido a los microtúbulos mediante esta última proteína (revisado por Kalderon (1997); Fig. 13). En estas condiciones Ci se procesa mediante la eliminación proteolítica del extremo carboxilo terminal (Fig. 13). La forma procesada resultante, Ci75, contiene los dedos de zinc, es capaz de unirse al DNA, se localiza en el núcleo y reprime la expresión de alguno de los genes bajo el control de HH como *patched* (Aza-Blanc *et al.*, 1997). La unión de HH a su receptor resulta en la separación del complejo proteico de los microtúbulos, Fu y Cos2 se hiperfosforilan y cesa el procesamiento de Ci (Fig. 13). La disminución de los niveles de Ci75, que reprime la expresión de algunos genes, y el aumento de los niveles de la forma entera de Ci (Ci155), un producto modificado de la cual activa la expresión de otros genes, da como resultado la activación de la expresión de los genes regulados por Hh. Si bien en ningún caso se ha conseguido localizar Ci155 en el núcleo (esta proteína siempre ha sido localizada en el citoplasma) diversas evidencias experimentales favorecen la hipótesis de que una forma modificada del producto primario de traducción de *ci* es un activador transcripcional. Así, Ci es necesario para que HH pueda inducir la expresión tanto de *wg* como de *ptc* en embriones de *Drosophila* (en presencia de HH ninguno de estos dos genes se expresa en embriones con una mutación nula en *ci*) y se han detectado sitios de unión de Ci en los promotores de estos dos genes que son suficientes para activar la expresión de genes heterólogos en respuesta a Ci (Von Ohlen y Hooper, 1997; Von Ohlen *et al.*, 1997). Además, la activación de la expresión génica regulada por Hh requiere un coactivador (CBP) que se une a una región de Ci que no está presente en Ci75 (Akimaru *et al.*, 1997). Recientemente Méthot y Basler, (1999) han mostrado evidencias de la existencia de una forma activadora de Ci que no sólo se obtiene previniendo su procesamiento en respuesta a la señal Hh, sino que además requiere un paso adicional de regulación dependiente de esta señal.

4 TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL INTERIOR NUCLEAR.

La existencia de núcleos en las células eucariotas implica que los procesos de transcripción y traducción tienen lugar en compartimentos celulares distintos, de forma que las proteínas nucleares, que son sintetizadas en el citoplasma, deben entrar en el núcleo para poder desempeñar su función. Todo el paso de moléculas hacia el interior o hacia el exterior del núcleo tiene lugar a través de los complejos del poro nuclear (NPCs), localizados en la membrana nuclear. Los NPCs (revisado por Hannover, 1992; Davis, 1995; Doye y Hurt, 1997) son unos complejos de aproximadamente 125.000 kDa formados por múltiples copias de 50 a 100 proteínas distintas denominadas genéricamente nucleoporinas (Reichelt *et al.*, 1990). Los NPCs constan de un canal acuoso en su parte central a través del cual tiene lugar el paso de moléculas hacia ambos lados de la membrana nuclear (Rout *et al.*, 1993). Dependiendo del estado metabólico y de diferenciación celular, puede haber entre 100 y 5×10^7 NPCs en un núcleo. Mientras que proteínas de peso molecular inferior a 40-60 kDa en principio pueden difundir a través de los NPCs, proteínas de mayor peso molecular deben ser "transportadas" activamente para poder localizarse en el interior nuclear (Görlich y Mattaj, 1996; Nigg, 1997; Fujihara y Nadler, 1998). El transporte activo de proteínas al núcleo es un proceso saturable, mediado por receptores de transporte, que requiere energía y la presencia de una señal de importación al núcleo en la proteína transportada. Las señales de importación al núcleo mejor caracterizadas son las clásicas señales de localización nuclear (NLSs) formadas por una agrupación de residuos básicos o por dos agrupaciones de este tipo de residuos separadas por una secuencia de 10 a 12 residuos (NLSs de tipo bipartito) (revisado por Dingwal y Laskey, 1991; Bouliskas, 1994; Jans y Hübner, 1996). Recientemente se identificó una secuencia, denominada dominio M9, que es la señal de importación de la ribonucleoproteína heteronuclear A1 (hnRNPA1), que no está relacionada con las clásicas NLSs (Siomi y Dreyfuss, 1995). Las proteínas que contienen una NLS y las proteínas que contienen el dominio M9 no compiten entre ellas por su transporte al núcleo y son reconocidas por diferentes receptores de transporte (Pollard *et al.*, 1996). Otro tipo de proteínas, las proteínas UsnRNPs, son transportadas al núcleo mediante un mecanismo de transporte diferente a los dos anteriores (Fischer *et al.*, 1991; Michaud y Goldfarb, 1991) y se piensa que pueden existir más mecanismos de transporte al núcleo.

El mecanismo de transporte al núcleo de proteínas que contienen una NLS es el mejor caracterizado (revisados por Schlenstedt, 1996; Pante y Aebi, 1996; Görlich y Mattaj, 1996; Görlich, 1997; Görlich, 1998; Mattaj y EnglMeier, 1998; Fig. 14). Este sistema de transporte requiere una serie de factores citoplásmicos como son las importinas α y β (que unidas constituyen el receptor/transportador), el factor de transporte nuclear 2 (NTF2) y la GTPasa Ran. Al igual que otras GTPasas, Ran alterna entre una forma unida a GTP (RanGTP) y una

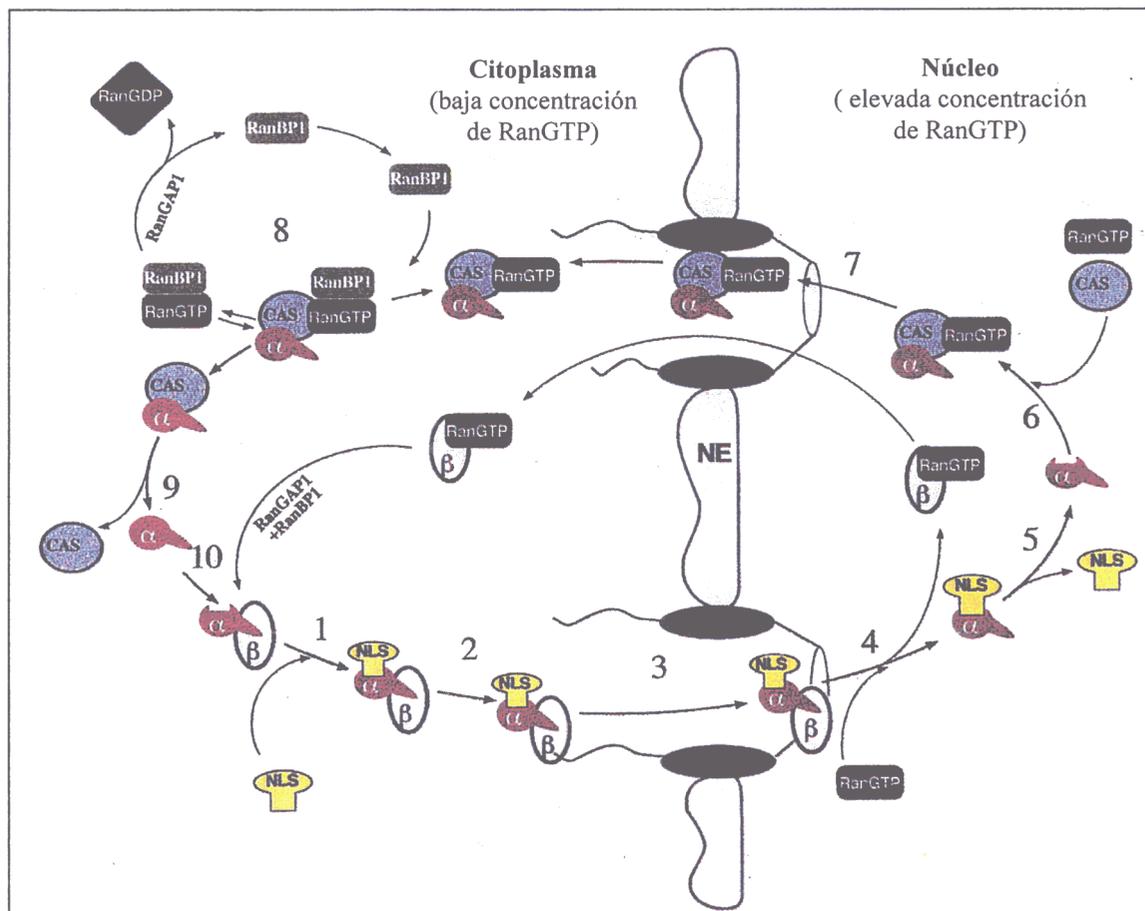


Figura 14. Modelo del mecanismo de transporte al núcleo de proteínas conteniendo una NLS. (1) Unión del sustrato (proteína que va a ser transportada) al heterodímero importina α/β . (2) Anclaje del complejo trimérico resultante al NPC. (3) Translocación del complejo al interior nuclear. (4) Separación de heterodímero importina α/β mediante la unión de RanGTP a la importina β . (5) Liberación del sustrato. (6) Formación del complejo trimérico importina α /CAS/RanGTP. (7) Exportación del complejo al citoplasma. (8) Separación de RanGTP del complejo trimérico mediada por su unión a RanBP1 y posterior hidrólisis de GTP inducida por RanGAP1. (9) Separación de las proteínas Cas e importina α . (10) Formación de un nuevo heterodímero importina α/β que puede iniciar un nuevo ciclo de transporte al interior nuclear. α , importina α ; β , importina β ; NLS, proteína que contiene una NLS; NE, membrana nuclear. Tomado de Görlich (1998).

forma unida a GDP (RanGDP) mediante la hidrólisis de GTP y el intercambio del nucleótido trifosfato unido a la proteína. Estas reacciones tienen lugar a una velocidad muy lenta y normalmente son facilitadas por las proteínas RCC1, RanGAP1 y RanBP1, que junto con Ran, constituyen el denominado sistema Ran. RCC1, el principal intercambiador de nucleótidos de Ran, genera RanGTP a partir de RanGDP (Bischoff y Ponstingl, 1991); RanGAP1, la única proteína activadora de la actividad GTPasa de Ran, favorece la conversión de GTP en GDP (Bischoff y Ponstingl, 1995) y RanBP1 es una proteína que se une específicamente a RanGTP

y es necesaria para que RanGAP1 pueda activar la actividad GTPasa de Ran (Bischoff *et al.*, 1995; Coutavas *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 1995). Una de las características más importantes del sistema Ran es la distribución asimétrica de sus componentes. El propio Ran, si bien es detectable en los NPCs y en el citoplasma, se localiza preferentemente en el núcleo (Bischoff y Ponstingl, 1991). RCC1 es una proteína ligada a la cromatina (Ohtsubo *et al.*, 1989) (de forma que RanGTP se forma exclusivamente en el núcleo). Las proteínas RanGAP1 y RanBP1, exclusivamente citoplásmicas (Hopper *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 1996), eliminan RanGTP de este compartimento celular. Esta distribución asimétrica de los componentes del sistema Ran da lugar a un gradiente de concentración de RanGTP a través de la membrana nuclear de forma que la concentración de RanGTP es muy elevada en el núcleo y muy baja en el citoplasma. Esta distribución asimétrica de RanGTP es necesaria para que el transporte al núcleo de proteínas conteniendo una NLS sea unidireccional, de forma que el sustrato sólo pueda unirse a su receptor transportador en el citoplasma y sólo pueda separarse del mismo en el núcleo (Izaurralde *et al.*, 1997).

El primer paso en el transporte al núcleo de una proteína conteniendo una NLS (Fig14) es su unión a la proteína transportadora, el heterodímero importina α/β , siendo la importina α la que proporciona el sitio de unión a la NLS (Adam y Adam, 1994). Posteriormente el complejo trimérico NLS/importina α/β se ancla al NPC mediante la importina β (proceso que no requiere energía) y, a continuación, es translocado al interior del núcleo mediante un proceso que requiere energía y depende de la hidrólisis de GTP por Ran (Melchior *et al.*, 1993; Moore y Blobel, 1993). Ya en el interior del núcleo, la unión de RanGTP a la importina β resulta en la separación de los componentes del complejo (Rexach y Blobel, 1995; Chi *et al.*, 1996; Görlich *et al.*, 1996) liberándose, en consecuencia, la proteína transportada. La importina β es probablemente exportada al citoplasma como un complejo con RanGTP (Izaurralde *et al.*, 1997) y la importina α es exportada como un complejo trimérico formado por esta proteína, RanGTP y el transportador específico de la importina α , CAS (Kutay *et al.*, 1997). En el citoplasma la unión de RanBP1 a RanGTP permite tanto la separación de los componentes de los dos complejos exportados (RanGTP/importina β y RanGTP/CAS/importina α) como la unión de RanGAP1 a RanGTP que resulta en la conversión de RanGTP en RanGDP. En ausencia de RanGTP las importinas α y β se asocian formando un receptor funcional que puede iniciar un nuevo ciclo de transporte al interior nuclear. Las moléculas de RanGDP formadas son transportadas al núcleo por NTF2 y ya dentro del núcleo RCC1 se une a la molécula RanGDP del complejo RanGDP/NTF2 permitiendo su separación de NTF2 y la sustitución de GDP por GTP (Ribbeck *et al.*, 1998).

Al igual que para el transporte de proteínas conteniendo una NLS, Ran parece ser necesario para el transporte al núcleo de proteínas conteniendo el dominio M9, cuyo

transportador específico es la transportina (Pollard *et al.*, 1996), así como para el transporte al núcleo de las snRNPs (Palacios *et al.*, 1996)

4.1 Regulación de la actividad de factores de transcripción mediante la regulación de su localización nuclear.

Una forma de regular la actividad de un número creciente de factores de transcripción consiste en regular su localización nuclear, de forma que el factor de transcripción sólo pueda localizarse preferentemente en el núcleo en respuesta a las señales que resultan en su activación. En ausencia de estas señales o bien la señal de importación al núcleo del factor de transcripción está enmascarada, localizándose la proteína en el citoplasma, o bien el factor de transcripción permanece anclado a alguna de las membranas celulares. En el primer caso, el enmascaramiento puede ser debido a fosforilaciones de determinados residuos dentro de la NLS o en sus proximidades o a interacciones intramoleculares (con dominios del propio factor de transcripción) o intermoleculares (con otras proteínas) que hacen que la NLS no sea accesible. Algunos factores de transcripción tienen, además de la NLS, una señal de exportación nuclear (NES), de forma que su localización nuclear se modula regulando tanto su entrada al núcleo como su salida de este orgánulo.

4.1.1 Enmascaramiento de la NLS por fosforilación.

La proteína Swi5p de *S. cerevisiae* es uno de los primeros casos descritos de un factor de transcripción cuya NLS se enmascara por fosforilación de residuos específicos contenidos en la señal o próximos a ella. Swi5p es un factor de transcripción necesario para la meiosis que se localiza en el núcleo durante la fase G1 del ciclo celular y en el citoplasma durante el resto de las fases del ciclo. La fosforilación por la quinasa CDC28 de tres residuos de serina, dos de ellos contenidos dentro de la NLS y el otro localizado en sus proximidades, es responsable de la exclusión nuclear de esta proteína (Moll *et al.*, 1991). Durante la fase G1 del ciclo celular la actividad de CDC28 decae, los residuos de serina se defosforilan y Swi5p se localiza en el núcleo. La sustitución de estas tres serinas por alaninas resulta en una proteína cuya localización es siempre nuclear (Moll *et al.*, 1991).

Otro ejemplo en *S. cerevisiae* es el factor de transcripción Pho4 implicado en la expresión de genes necesarios en condiciones de privación de fosfato (Oshima *et al.*, 1997). En respuesta a la presencia de fosfato en el medio, Pho4 es fosforilado por el complejo ciclina-quinasa dependiente de ciclina Pho80-Pho85. La forma fosforilada de Pho4 no puede unirse a

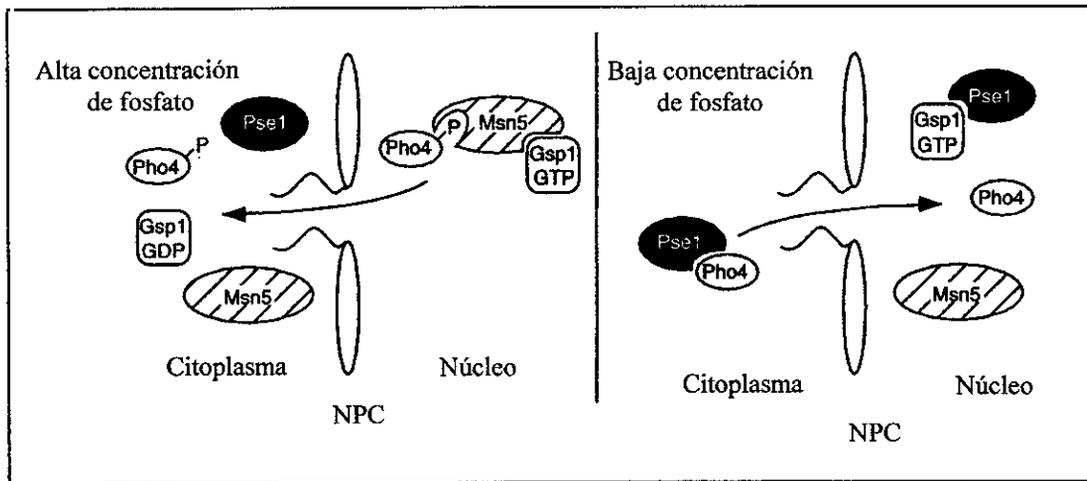


Figura 15. Modelo de la regulación de la localización nucleocitoplásmica de Pho4p en respuesta a la concentración extracelular de fosfato. En respuesta a la presencia de fosfato en el medio (izquierda) Pho4 es fosforilado (por el complejo Pho80-Pho85). El factor fosforilado es reconocido por una proteína exportadora (Msn5) que lo transporta al citoplasma donde no puede ser reconocido por su proteína importadora. En condiciones de privación de fosfato (derecha) el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina Pho81 inhibe la actividad de Pho80-Pho85 y aumentan los niveles de la forma no fosforilada de Pho4 que es reconocida por su receptor de importación y transportada al núcleo donde no puede ser reconocido por Msn5. GSP1, homólogo de Ran en levaduras. Tomado de Kaffman *et al.* (1998).

su receptor de importación (Pse/Kap121) y Pho4 se localiza en el citoplasma. En condiciones de privación de fosfato el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina Pho81 inhibe la actividad de Pho80-Pho85 (Schneider *et al.*, 1994) y aumentan los niveles de la forma no fosforilada de Pho4 que es reconocida por su receptor de importación y transportada al núcleo (Fig. 15).

Un ejemplo similar en vertebrados es el de la familia de proteínas NF-AT, implicada en la regulación de genes necesarios para la respuesta inmune. Estas proteínas son capaces tanto de unirse al DNA como de activar la transcripción cuando son aisladas del citosol, lo que sugiere que su actividad se regula modulando su localización nuclear (Flanagan *et al.*, 1991). La activación de las proteínas NF-AT se produce en respuesta al aumento a la concentración de calcio intracelular desencadenada por diferentes estímulos. Este aumento de la concentración intracelular de calcio activa la calcineurina, una fosfatasa que defosforila residuos críticos de serina en las proteínas NF-AT. Esta defosforilación permite el desenmascaramiento de dos NLSs que permiten la localización nuclear de estos factores de transcripción (Beals *et al.*, 1997; Fig. 16).

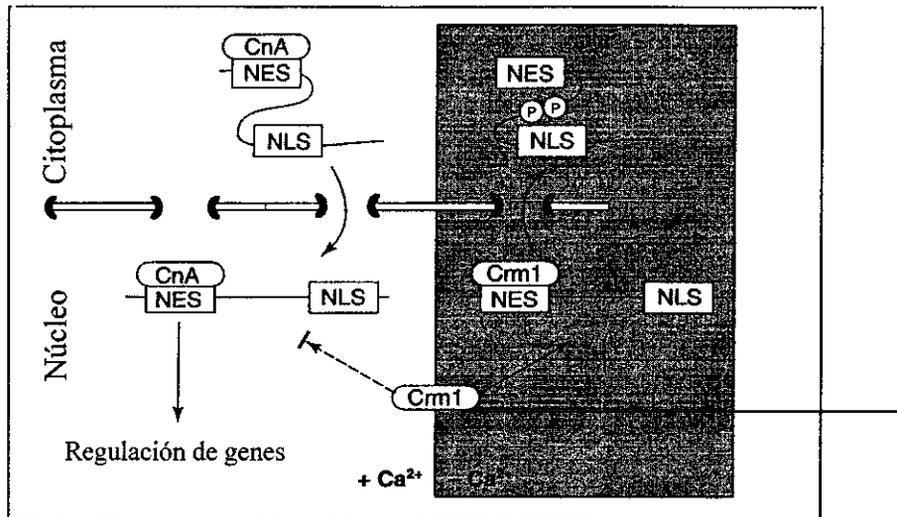


Figura 16. Modelo de regulación de la localización nucleocitoplásmica de NF-AT en respuesta a la concentración intracelular de Ca^{2+} . En presencia de Ca^{2+} la fosfatasa calcineurina (CnA) se une a NF-AT y defosforila residuos críticos de serina, permitiendo el desenmascaramiento de dos NLSs y el transporte al núcleo del factor de transcripción unido a la calcineurina. En respuesta a una disminución de la concentración de calcio intracelular, la calcineurina se separa de NF-AT y los residuos críticos de serina se fosforilan, lo que provoca el enmascaramiento de las NLSs y el desenmascaramiento de dos NESs, que son reconocidas por el receptor de exportación Crm1, que media el transporte del factor de transcripción al citoplasma. Tomado de Zhu y McKeon, 1999.

4.1.2 Enmascaramiento de la NLS por interacciones intermoleculares.

Entre los ejemplos de factores de transcripción retenidos en el citoplasma mediante su interacción con otras proteínas están el receptor de glucocorticoides en mamíferos (GR), el factor nuclear de *Xenopus* Xnf7, NF- κ B y Dorsal.

En ausencia de la hormona glucocorticoide (GH), el receptor de esta hormona (GR) permanece unido a la proteína Hsp90, que enmascara una NLS del receptor reteniéndolo en el citoplasma (Picard *et al.*, 1988). La unión de la hormona al receptor provoca la disociación del complejo, la NLS queda desenmascarada y el receptor unido a la hormona puede ser transportado al núcleo (Picard *et al.*, 1988).

El factor de transcripción Xnf7 de *Xenopus* es el producto de un gen de acción materna necesario para establecer la polaridad dorso-ventral. Xnf7 es retenido en el citoplasma hasta el estadio del desarrollo embrionario en que es necesaria su función, momento en que es defosforilado y se localiza en el núcleo (Li *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1991). El efecto inhibitorio de la fosforilación de Xnf7 afecta a un dominio de 22 aminoácidos denominado dominio de

retención citoplásmica, que es activo cuando la proteína está fosforilada e inactivo cuando está defosforilada (Li *et al.*, 1994). Este dominio es dominante incluso en presencia de una NLS adicional a la de Xnf7 lo que indica que la retención citoplásmica de este factor de transcripción, a diferencia de la de NF- κ B, no es debida al enmascaramiento de su NLS (Li *et al.*, 1994).

En el caso de NF- κ B y Dorsal (ver sección 3.1 de esta introducción), la unión a estos factores de transcripción de sus correspondientes proteínas inhibitoras (κ B y Cactus, respectivamente) enmascara sus NLSs y los retiene en el citoplasma. En respuesta a sus respectivas señales activadoras estos factores de transcripción se separan de su proteína inhibitora (mediante un proceso que normalmente implica la degradación de esta última), sus NLSs quedan desenmascaradas y pueden ser transportados al núcleo.

4.1.3 Enmascaramiento de la NLS por interacciones intramoleculares.

NF- κ B representa también un ejemplo de un factor de transcripción en el que una interacción intramolecular enmascara la NLS (ver sección 3.2 de introducción). Este es el caso de los dímeros formados por p105 y otras proteínas de la familia Rel, como p65. En estos dímeros el extremo carboxilo terminal de p105 enmascara la NLS de p50 previniendo la localización nuclear del complejo. El hecho de que anticuerpos específicos contra la NLS reconozcan p50 pero no p105 confirma que la NLS es inaccesible en esta última proteína (Henkel *et al.*, 1992).

4.1.4 Factores de transcripción anclados a membranas celulares.

Las proteínas SREBP son un claro ejemplo de factores de transcripción que permanecen anclados a distintas membranas celulares hasta que son activados (ver sección 3.2 de introducción). La activación de estos factores (en respuesta a una baja concentración intracelular de esteroides) implica la liberación del extremo amino terminal de la proteína (que contiene la parte funcional del factor de transcripción) mediante dos cortes proteolíticos secuenciales. El factor de transcripción liberado entra rápidamente en el núcleo y regula la expresión de genes bajo su control.

Un segundo ejemplo lo constituyen los receptores de membrana de la familia Notch, presentes en *Drosophila*, *C. elegans*, ratón y otros organismos (revisado por Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Kimble y Simpson, 1997; Greenwald, 1998). Estas proteínas son

necesarias durante el desarrollo para el establecimiento de contactos intercelulares necesarios para la diferenciación celular. Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática (a la que se unen mediante un dominio transmembrana) y tienen los extremos amino y carboxilo terminales dirigidos hacia el exterior celular y el citoplasma, respectivamente. En respuesta a la unión de determinados ligandos, el dominio intracelular de Notch se libera mediante proteólisis, entra en el núcleo y permite la expresión de genes bajo su control mediante su unión a los factores de transcripción de la familia CSL.

4.1.5 Factores de transcripción cuya localización nuclear se regula modulando su importación y su exportación nuclear.

Recientemente se ha demostrado que en el caso de los factores de transcripción Pho4 y NF-AT (ver sección 4.1.1 de esta introducción) la localización nuclear se regula modulando tanto su entrada en el núcleo (importación) como su salida de este compartimento celular (exportación) y que en ambos casos la fosforilación de la proteína previene la importación y favorece la exportación. En el caso de Pho4 (Kaffman *et al.*, 1998; Fig. 15) el complejo Pho80-Pho85 (responsable de la fosforilación de este factor) se localiza en el núcleo de forma que la fosforilación de Pho4 sólo tiene lugar en este compartimento celular. En respuesta a la presencia de fosfato en el medio Pho4 es fosforilado. El factor fosforilado es reconocido por una proteína exportadora (Msn5) que lo transporta al citoplasma donde no puede ser reconocido por su proteína importadora. En condiciones de privación de fosfato la forma no fosforilada del factor de transcripción predomina y Pho4 es transportado al núcleo de donde no puede ser exportado.

En el caso de NF-AT (Zhu y McKeon, 1999; Fig. 16) la calcineurina entra al núcleo unida a este factor de transcripción, manteniéndolo defosforilado y bloqueando, mediante su unión, dos señales de exportación nuclear (NESs) reconocidas por el receptor de exportación Crm1. Al disminuir la concentración de calcio intracelular, la calcineurina se separa de NF-AT, el factor de transcripción se fosforila (con lo que sus NLSs quedan enmascaradas) y Crm1 puede unirse a las NESs de este factor de transcripción exportándolo al citoplasma.

5 OBJETIVOS DE LA TESIS.

Los objetivos que se plantearon para este estudio se detallan a continuación:

- i) Estudiar el procesamiento de PacC en respuesta al pH ambiental alcalino: establecer formalmente la existencia de una relación precursor - producto entre el producto primario de

traducción y la forma procesada de la proteína; determinar el límite del procesamiento; establecer si el procesamiento afecta o no al extremo amino terminal de la proteína; estudiar cuál es el paso regulado por el pH ambiental.

ii) Estudiar si el pH ambiental regula la localización nuclear de PacC.

iii) Caracterizar posibles señales de localización nuclear en PacC.

iv) Estudiar si *pacC* regula positivamente su propia expresión.

v) Estudiar si el producto primario de traducción de *pacC* puede ejercer alguna función moduladora sobre la función *pacC*.

6 RESUMEN DE RESULTADOS.

En el trabajo de esta tesis se han estudiado diferentes aspectos de la activación del factor de transcripción PacC (factor que media la regulación por pH de la expresión génica en *A. nidulans*) en respuesta a un pH ambiental alcalino.

Mediante experimentos de expresión transitoria (basados en la expresión condicional de proteínas bajo el control del promotor regulable de la alcohol deshidrogenasa (*alcA^P*)) de las proteínas PacC(5-678) (producto primario de traducción) y PacC(5-265) (proteína similar a la forma procesada de PacC) en los fondos genéticos *palA⁺* y *palA1*, se ha demostrado que el producto primario de traducción de *pacC* es relativamente inestable, debido a su procesamiento proteolítico para dar lugar a una forma de la proteína mucho más estable y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino codificada por los genes *pal*, es necesaria para que este procesamiento pueda tener lugar.

La caracterización y el uso de un elevado número de mutaciones en *pacC*, ha permitido estudiar aspectos importantes del procesamiento de PacC. El análisis de proteínas mutantes que carecían del principal codón de inicio de traducción, o truncadas a distintas distancias del extremo carboxilo terminal, ha permitido comprobar que el procesamiento no afecta al extremo amino terminal de la proteína; que da lugar a varios productos de tamaño muy similar (forma procesada de PacC) y que el punto de corte más amino terminal de la proteasa procesativa está en la triada de aminoácidos Lys252-Lys253-Arg254 o en su inmediata vecindad. Aparentemente el pH ambiental regula la accesibilidad de PacC a la proteasa procesativa. Las mutaciones constitutivas *pacC^C39*, *pacC^C63* y *pacC^C69* que resultan en los cambios L266F, L259R y L340S, respectivamente, favorecen la conformación accesible a la proteasa procesativa, mientras que los cambios Y455N o la delección de la región comprendida entre los aminoácidos 465 y 540 bloquean la proteína en la conformación no accesible a la proteasa procesativa.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la localización subcelular de PacC (mediante fraccionamiento subcelular y posterior análisis de PacC en las distintas fracciones) en una estirpe silvestre y en estirpes con diferentes mutaciones *pacC^c* o *pal*, ha permitido comprobar que el pH ambiental, al permitir el cambio conformacional de PacC entre las conformaciones no accesible y accesible a la proteasa procesativa, regula el procesamiento de PacC y, de forma simultánea, su localización nuclear, de manera que la forma procesada de la proteína siempre se localiza en el núcleo. Las mutaciones de pérdida de función en los genes *pal*, al prevenir el cambio conformacional de PacC, bloquean el procesamiento y previenen su localización nuclear.

La expresión de proteínas de fusión entre diferentes proteínas PacC y la proteína fluorescente GFP ha permitido comprobar *in vivo* que el pH regula la localización nuclear de PacC y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental codificada por los genes *pal* es necesaria para esta regulación. En segundo lugar estos experimentos han permitido mostrar que la supuesta señal de localización nuclear de tipo bipartita comprendida entre los aminoácidos 252 y 269 no parece ser funcional, que la localización nuclear de la forma procesada de PacC es independiente de la funcionalidad de la ruta *pal* y que la región de PacC que contiene los dedos de zinc es necesaria para que proteínas PacC similares en tamaño a la forma procesada de la proteína se localicen en el núcleo.

El estudio de los niveles de transcrito de *pacC* en estirpes merodiploides que expresaban la proteína funcional PacC(5-265) así como el análisis de PacC en estas estirpes y en distintas estirpes diploides, ha mostrado que *pacC* no regula positivamente su propia expresión. Finalmente el estudio de los efectos a nivel fenotípico y molecular de la sobreexpresión de PacC(5-678) en estirpes *pacC⁺* y *pacC^c14*, tanto en un fondo genético *palA⁺* como en un fondo *palA1*, indica que el producto primario de traducción de *pacC* no es inactivo y que puede modular negativamente la función *pacC*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1 Estirpes de Bacterias.

En este trabajo se han utilizado las estirpes de *E. coli* DH1 (F⁻, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*) y DH5 α ' (F⁺, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA1*, *thi1*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, Φ 80r, *lacZ* Δ M15), ambas del tipo K-12 (las mutaciones de *E. coli* se describen en Bachman (1984)). La estirpe DH1 se ha utilizado como cepa de alta frecuencia de transformación. Esta estirpe, al carecer del sistema de recombinación dependiente de *recA*, no forma multímeros y resulta útil para la obtención de plásmidos.

La estirpe DH5 α ' se ha utilizado para la transformación con plásmidos de alto peso molecular. Esta estirpe permite la selección de plásmidos recombinantes por interrupción del dominio α del gen de la β -galactosidasa en medio con IPTG y X-gal.

1.2 Estirpes de *Aspergillus nidulans*

Las cepas de *A. nidulans* se muestran en la tabla 1 y las mutaciones clásicas en *pacC* utilizadas en este trabajo, en la tabla 2. Todas las estirpes portan una mutación de pérdida de función en *veA* ("velve"), que permite la conidiación en presencia de luz (Mooney y Yager, 1990). Los marcadores se describen en Clutterbuk (1990).

2. VECTORES.

Los plásmidos comerciales pBS-SK+ (Stratagene), pUC19 (Biolabs) y pGEX2T (Pharmacia) se utilizaron para subclonajes de fragmentos de DNA. En el resto de los plásmidos se indica, entre paréntesis, el número asignado en la colección del laboratorio.

En todos los casos en que se amplificaron fragmentos de DNA por la Técnica de P.C.R. (y una vez clonado el fragmento) se verificó por secuenciación la ausencia de errores en la secuencia amplificada.

Los genes que se expresaron bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa (*alcA*^P) fueron clonados en el plásmido pALC (p182) (Fernández-Cañón y Peñalva, 1995; Fig. 17). Este plásmido contiene un promotor *alcA*^P funcional que incluye un sitio de inicio de transcripción y está separado del terminador transcripcional del gen *trpC* (situado en posición 3' con respecto al promotor) por un "polylinker" 5'- *SalI*-*XbaI*-*Bam*HI-*Sma*I-*Pst*I-*Eco*RI - 3'. El terminador transcripcional del gen *trpC* se clonó como un fragmento *Eco*RI - *Kpn*I de 3,2 Kb que incluye en posición 3' al terminador el gen *argB*, que se ha utilizado como marcador en las transformaciones de *A. nidulans*. Se han utilizado dos versiones del plásmido, una con el alelo *argB*⁺ (pALC) y la otra con un alelo *argB* mutado (pALC*) (para seleccionar integraciones en *argB*) mediante destrucción de un sitio *Bgl*II (el plásmido se abrió con *Bgl*II, se rellenaron los extremos cohesivos con Klenow, y posteriormente se religó), con lo que se introduce una mutación de cambio de pauta de lectura.

p[*alcA*^P::*pacC*(5-678)] (p138). Este plásmido se construyó subclonando en el sitio *Bam*HI del plásmido pALC un fragmento de cDNA conteniendo toda la secuencia codificante de *pacC*. Este fragmento estaba flanqueado por un sitio *Nco*I (que fue transformado en un sitio *Bam*HI) y un sitio

| Estirpe | Característica relevante | Genotipo | Procedencia |
|---------|--|---|-------------------|
| M 002 | <i>pacC</i> ⁺ | <i>biA1</i> | Madrid |
| M 334 | <i>palA1</i> | <i>pabaA1 yA2; palA1 argB2</i> | H. Arst (Londres) |
| M 384 | <i>PalH17</i> | <i>pabaA1 yA2; PalH17</i> | H. Arst (Londres) |
| M 162 | <i>pacC</i> ^{+/} -7604 | <i>inoB2; pacC</i> ^{+/} -7604 | H. Arst (Londres) |
| M 163 | <i>pacC</i> ^{+/} -508 | <i>pabaA1 yA2; pacC</i> ^{+/} -508 | H. Arst (Londres) |
| M 207 | <i>pacC</i> ^c 50 | <i>pabaA1; pacC</i> ^c 50 | H. Arst (Londres) |
| M 305 | <i>pacC</i> ^c 14 | <i>pabaA1; pacC</i> ^c 14 | H. Arst (Londres) |
| M 390 | <i>pacC</i> ^c 69 | <i>pabaA1 yA2; wA3; pacC</i> ^c 69 | H. Arst (Londres) |
| M 372 | <i>pacC</i> ^c 14; <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678) | <i>biA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678); <i>methG1; pacC</i> ^c 14 | Este trabajo |
| M 265 | Δ <i>pacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2; ΔpacC [pyr4⁺]</i> | H. Arst (Londres) |
| M 397 | <i>palA1 argB2; ΔpacC</i> | <i>yA2; argB2 palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 133 | <i>pacC</i> ^c 5 | <i>pabaA1; pacC</i> ^c 5 | H. Arst (Londres) |
| M 485 | <i>pacC</i> ^c 504 | <i>pabaA1 yA2; argB2; pacC</i> ^c 5 <i>pacC</i> ^c 504 | H. Arst (Londres) |
| M 205 | <i>pacC</i> ^c 39 | <i>biA1; pyroA4; pacC</i> ^c 39 | H. Arst (Londres) |
| M 191 | <i>pacC</i> ^c 63 | <i>pacC</i> ^c 63; <i>pantoB100</i> | H. Arst (Londres) |
| M 391 | <i>pacC</i> ^{+/} -207 | <i>inoB2 glrA1; pacC</i> ^{+/} -207; <i>panto B100</i> | H. Arst (Londres) |
| M 164 | <i>pacC</i> ^{+/} -515 | <i>yA2, pacC</i> ^{+/} -515; <i>pantoB100</i> | H. Arst (Londres) |
| M 218 | <i>pacC</i> ^c /-20601 | <i>pacC</i> ^c 206 <i>PacC</i> ^c /-20601; <i>pantoB100</i> | H. Arst (Londres) |
| M 199 | <i>pacC</i> ^c /-20000 | <i>yA2; pacC</i> ^c 200 <i>PacC</i> ^c /-20000; <i>pantoB100 gatA2</i> | H. Arst (Londres) |
| M 416 | <i>pacC</i> ^c /-6907 | <i>pabaA1; wA3; pacC</i> ^c 69 <i>PacC</i> ^c /-6907 | H. Arst (Londres) |
| M 363 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678) <i>pacC</i> ⁺ | <i>yA2; pabaA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678) | Este trabajo |
| M 368 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-234::265-678) <i>pacC</i> ⁺ | <i>biA1 pabaA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-234::265-678) | Este trabajo |
| M 374 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678) <i>pacC</i> ⁺ | <i>biA1 pabaA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678) | Este trabajo |
| M 367 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-265) <i>pacC</i> ⁺ | <i>biA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-265) | Este trabajo |
| M 365 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-265) <i>palA1 pacC</i> ⁺ | <i>yA2 pabaA1; palA1 argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-265) | Este trabajo |
| M 364 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678) <i>pacC</i> ^c 14 | <i>yA2; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678); <i>methG1; pacC</i> ^c 14 | Este trabajo |
| M 636 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678) <i>palA1 pacC</i> ^c 14 | <i>yA2 pabaA1; palA1 argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-678); <i>pacC</i> ^c 14; <i>pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 369 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-234::265-678) <i>pacC</i> ^c 14 | <i>yA2 pabaA1; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (5-234::265-678); <i>pacC</i> ^c 14 | Este trabajo |
| M 372 | <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678) <i>pacC</i> ^c 14 | <i>biA1 yA2; argB2/argB</i> ⁺ <i>alcA</i> ^P :: <i>pacC</i> (305-678); <i>methG1; pacC</i> ^c 14 | Este trabajo |

Tabla1. Estirpes de *A. nidulans* utilizadas en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

| Estirpe | Característica relevante | Genotipo | Procedencia |
|---------|---|--|-------------------|
| M 357 | <i>alcA^P::pacC(5-678) ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-678); ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 326 | <i>alcA^P::pacC(5-265) ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-265); ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 360 | <i>alcA^P::pacC(5-234::265-678) ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-234::265-678); ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 479 | <i>alcA^P::GFP ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺ alcA^P::GFP; ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 701 | <i>alcA^P::pacC(241-280)::GFP ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺; alcA^P::pacC(241-280)::GFP; ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 481 | <i>alcA^P::pacC(5-265)::GFP ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺; alcA^P::pacC(5-265)::GFP; ΔpacC pyr4⁺</i> | Este trabajo |
| M 500 | <i>alcA^P::pacC(5-250)::GFP ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺; alcA^P::pacC(5-250)::GFP; ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 502 | <i>alcA^P::pacC(5-273)::GFP ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺; alcA^P::pacC(5-273)::GFP; ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 561 | <i>alcA^P::GFP::pacC(5-250) ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89; argB2/argB⁺; alcA^P::GFP::pacC(5-250); ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 702 | <i>alcA^P::pacC(241-280)::GFP palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(241-280)::GFP palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 520 | <i>alcA^P::pacC(5-250)::GFP palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-250)::GFP palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 523 | <i>alcA^P::pacC(5-265)::GFP palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-265)::GFP palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 526 | <i>alcA^P::pacC(5-273)::GFP palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::pacC(5-273)::GFP palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 570 | <i>alcA^P::GFP::pacC(5-250) palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::GFP::pacC(5-250) palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 566 | <i>alcA^P::GFP::pacC(5-678) ΔpacC</i> | <i>yA2 biA1 pabaA1; pyrG89 ?; argB2/argB⁺; alcA^P::GFP::pacC(5-678); ΔpacC [pyr4⁺]</i> | Este trabajo |
| M 578 | <i>alcA^P::GFP::pacC(5-678) palA1 ΔpacC</i> | <i>yA2; pyrG89 ?; argB2/argB⁺ alcA^P::GFP::pacC(5-678) palA1; ΔpacC [pyr4⁺]; pantoB100</i> | Este trabajo |
| M 230 | <i>pacC⁺/pacC⁺</i> | <i>wA3 argB2 methG1 / yA2 argB2</i> | Este trabajo |
| M 212 | <i>pacC⁺/pacC^c</i> | <i>yA2 argB2 pacC14 / ornC31 fwA1</i> | H. Arst (Londres) |
| M 209 | <i>pacC⁺/pacC^{+/}</i> | <i>yA2 biA1 areA^f49 inoB2 pacC^{+/}-7604 /ornC31 fwA1</i> | H. Arst (Londres) |

Tabla 1. Continuación

*Bam*HI. El sitio *Nco*I incluía el codón AUG 5 y el sitio *Bam*HI estaba separado por 90 pb, en dirección 3', del codón de parada de traducción (codón stop).

| Alelo | Fenotipo | Mutación | Cambio en la proteína |
|---------------------------------|---------------------|----------------|------------------------------------|
| <i>pacC</i> 7604 | +/- | ΔC1426 | 5 – 173 QSLDLATQI* |
| <i>pacC</i> 508 | +/- | ΔC1631 | 5 – 224 SHRTRLTATSTTL* |
| <i>pacC</i> 50 | c | A1758T | 5 – 266* |
| <i>pacC</i> 14 | c | C2437A | 5 – 492* |
| <i>pacC</i> 69 | c | T1977C | L340S |
| <i>pacC</i> 6907 | c/- | C1666G | 5 – 235* |
| <i>pacC</i> 5 | c | C2528T | 5 – 523* |
| <i>pacC</i> 504(<i>pacC</i> 5) | ? ^a | G835C (C2528T) | M5I (5 – 523*) |
| <i>pacC</i> 39 | c (ts) ^b | C1754T | L266F |
| <i>pacC</i> 63 | c | T1734G | L259R |
| <i>pacC</i> 207 | +/- | T2321A | Y455N |
| <i>pacC</i> 515 | +/- | 1641 + A | 5 – 227 KPVLRQRLLRSEYRPRASPSVW* |
| <i>pacC</i> 20601 | c/- | G1739T | 5 – 260* |
| <i>pacC</i> 20000 | c/- | 1711 + C | 5 – 251 QEAGL* |

Tabla 2. Mutaciones clásicas en *pacC* utilizadas en este trabajo y cambios a que dan lugar en la proteína. ^a La presencia de la mutación *pacC*⁵ impide determinar el fenotipo resultante de *pacC*504. ^b ts, fenotipo termosensible.

p[*alcA*^P::*pacC*(5-265)] (p99). Para obtener este plásmido, inicialmente se subclonó un fragmento *Nco*I – *Bst*EII (rellenado con Klenow) del cDNA de *pacC* en el sitio *Sma*I del plásmido pGEX2T (con objeto de introducir los sitios *Bam*HI (5') y *Eco*RI (3')) con lo que se obtuvo el plásmido **pGEX (5-265)** (p84). Posteriormente se clonó el fragmento *Bam*HI – *Eco*RI de este plásmido en pALC.

p[*alcA*^P::*pacC*(5-234::265-678)] (p139). El fragmento *Bam*HI – *Eco*RI obtenido tras la ligación de los fragmentos (rellenados con Klenow) *Bam*HI – *Acc*I del plásmido pGEX 5-265 y *Bst*EII – *Eco*RI del clon de cDNA de *pacC* pJB2 (Tilburn *et al.*, 1995), se clonó en el plásmido pGEX2T digerido con *Bam*HI y *Eco*RI. La secuencia de cDNA con la delección se clonó como un fragmento *Bam*HI en el plásmido pALC.

PAN 52-1 sGFP (p1144). Este plásmido (Cedido por Claudio Scazzocchio), contiene el gen *sGFP*-TYG (Haas *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 1996) clonado en el vector de expresión pAN 52-1 (Punt *et al.*, 1987) como un fragmento *Nco*I – *Bam*HI de 0,75 kb.

p[*alcA*^P::*GFP*] (p1145). Para obtener este plásmido, primero se subclonó un fragmento *Nco*I – *Bam*HI (rellenado con Klenow) del plásmido pAN 52-1 sGFP en el sitio *Sma*I de pGEX2T (con objeto de introducir los sitios *Bam*HI (5') y *Eco*RI (3')) obteniéndose el plásmido **pGEX – GFP** (p1146). Posteriormente se clonó el fragmento *Bam*HI – *Eco*RI de pGEX – GFP en el plásmido pALC*.

p[*alcA*^P::*pacC*(5-265)::*GFP*] (p1147). El fragmento *Nco*I – *Bam*HI del plásmido pAN 52-1 sGFP se rellenó con Klenow y se subclonó en el sitio *Eco*RV del plásmido pBS-SK+, con el fin de introducir dos sitios flanqueantes *Eco*RI, y el fragmento *Bam*HI – *Kpn*I del nuevo plásmido se clonó en el vector pUC19 obteniéndose el plásmido **pUC-GFP-BK** (p1148). Posteriormente se clonó (en la orientación correcta) un fragmento *Eco*RI de este plásmido (que contiene el gen de la GFP) en el sitio *Eco*RI del plásmido p[*alcA*^P::*pacC*(5-265)].

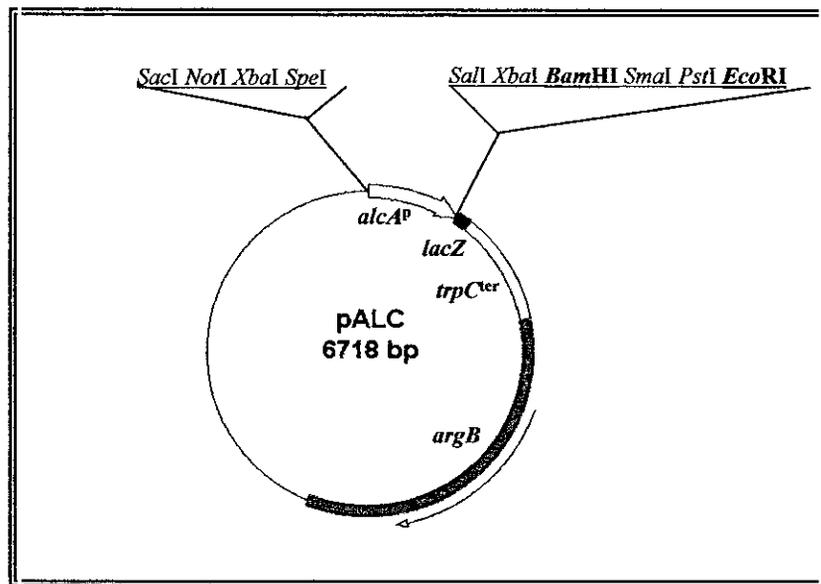


Figura 17. Esquema del plásmido pALC.

p[*alcA^P::pacC(5-250)::GFP*] (p1149). Utilizando como molde el plásmido p[*alcA^P::pacC(5-678)*] se obtuvo por P.C.R. un fragmento de 0,8 kb que contenía parte del promotor *alcA^P* en la región 5' y en cuyo extremo 3' contenía un sitio de corte *EcoRI* separado por 2 pb del codón GAA (E250) de *pacC*. Un fragmento *BamHI* - *EcoRI* del producto de P.C.R. se clonó en pALC* obteniéndose el plásmido **p[*alcA^P::pacC(5-250)*]** (p1150). Posteriormente se clonó en el sitio *EcoRI* de este plásmido (en la orientación correcta) el fragmento *EcoRI* (que contiene *GFP*) del plásmido pUC-*GFP*-BK. Para la amplificación del fragmento por P.C.R. se utilizaron los oligos *alcsec2* (oligo 5') y *pacC250-3'* (oligo 3') (tabla 3, pag. 56).

p[*alcA^P::pacC(5-273)::GFP*] (p1151). Este plásmido se obtuvo de igual forma que el anterior, con la única diferencia que en la P.C.R. se utilizó el oligo *pacC273-3'* (tabla 3, pag. 56) como oligo 3', lo que permitió obtener un fragmento con un sitio *EcoRI* separado por dos pb del codón CCT (P273) de *pacC*.

p[*alcA^P::pacC(241-280)::GFP*] (p1152). Mediante amplificación por P.C.R. a partir de p[*alcA^P::pacC(5-678)*] se obtuvo un fragmento de DNA codificando la región *PacC(241-280)* en el que se había introducido un corte *BamHI* seguido de un codón AUG en el extremo 5' y un corte *EcoRI* en el extremo 3'. Después de fosforilar los extremos del fragmento amplificado (tratamiento con PNK del fago T4) éste se clonó (en la orientación correcta) en el sitio *SmaI* del plásmido pBS-SK. En el nuevo plásmido recombinante se clonó un fragmento *NcoI* - *EcoRI* (que contiene *GFP*) del plásmido pGEx-*GFP* y finalmente se clonó un fragmento *BamHI* - *EcoRI* del último plásmido obtenido en el plásmido pALC* (Para la amplificación por P.C.R. se usaron los oligos *pacCNLS-5'* (oligo 5') y *pacCNLS-3'* (oligo 3') (tabla 3, pag. 56)).

p[*alcA^P::GFP::pacC(5-678)*] (p1153). Inicialmente se obtuvo por P.C.R. un fragmento de DNA codificando una versión de *GFP* en la que se eliminó el codón stop y se introdujo un corte *BamHI* en el extremo 5'. Se utilizaron los oligos *GFP-5'* (oligo 5') y *GFP-3'* (oligo 3') (tabla 3, pag. 56) y como molde

el plásmido PAN 52-1 sGFP. Después de fosforilar los extremos del fragmento amplificado (tratamiento con PNK del fago T4), éste se clonó en el sitio *Sma*I del plásmido pUC19 obteniéndose el plásmido **pUC BGFPB** (p1154). Finalmente se clonó (en la orientación correcta) un fragmento *Bam*HI del plásmido pUC BGFPB en el sitio *Bam*HI del plásmido p[*alcA*^P::*pacC*(5-678)].

p[*alcA*^P:: *GFP*::*pacC*(5-250)] (p1155). Este plásmido se obtuvo clonando (en la orientación correcta) un fragmento *Bam*HI del plásmido pUC BGFPB en el sitio *Bam*HI del plásmido p[*alcA*^P::*pacC*(5-250)].

p[*alcA*^P:: *GFP*::*pacC*(5-173)] (p1156). A partir del plásmido p[*alcA*^P::*pacC*(5-678)] se obtuvo por P.C.R. un fragmento que incluía parte del promotor *alcA*^P en su región 5' y en cuyo extremo 3' contenía un sitio de corte *Eco*RI separado por 2 pb del codón TCG (S173) de *pacC*. El producto de P.C.R. se fosforiló con la PNK del fago T4 y se clonó en el sitio *Sma*I de pUC19. Un fragmento *Bam*HI - *Eco*RI del plásmido recombinante se clonó en el plásmido pALC*. Posteriormente se clonó en el sitio *Bam*HI de este último plásmido (y en la orientación correcta) un fragmento *Bam*HI del plásmido pUC BGFPB. Los oligos utilizados para la amplificación por P.C.R. fueron el oligo *alcsec2* (oligo 5') y el oligo *pacC173-3'* (oligo 3') (tabla 3, pag. 56).

Los tres siguientes plásmidos se obtuvieron de forma exactamente igual a la descrita en este caso, variando únicamente los fragmentos amplificados por P.C.R.

p[*alcA*^P:: *GFP*::*pacC*(66-173)] (p1157). Para la amplificación por P.C.R. se utilizó como oligo 5' el oligo *pacC66-5'* (tabla 3, pag. 56), lo que permitió amplificar un fragmento de *pacC* cuyo extremo 5' (GCG (A66)) estaba precedido por un codón AUG, a su vez precedido por un sitio *Bam*HI. Como oligo 3' se utilizó el oligo *pacC173-3'* (tabla 3, pag. 56).

p[*alcA*^P:: *GFP*::*pacC*(66-250)] (p1158). En este caso se utilizaron los oligos *pacC66-5'* (oligo 5') (tabla 3, pag. 56) y el oligo *pacC250-3'* (oligo 3') (tabla 3, pag. 56).

p[*alcA*^P:: *GFP*::*pacC*(173-250)] (p1159). Al igual que en el caso anterior se utilizó como oligo 3' el oligo *pacC250-3'* (tabla 3, pag. 56). Como oligo 5' se utilizó el oligo *pacC173-5'* (tabla 3, pag. 56), lo que permitió amplificar un fragmento de *pacC* cuyo extremo 5' (TCG (S173)) estaba precedido por una secuencia que contenía (en sentido 5'-3') un sitio *Bam*HI un codón ATG y un codón GCC (A).

3 MEDIOS DE CULTIVO.

3.1 Medios para *E.coli*.

Se utilizó LB, (Sambroock *et al.*, 1989) como medio general para el crecimiento y mantenimiento de cepas transformadas. Este medio contiene: Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se añadió agar al 1,5 % (p/v) para el medio sólido. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, se añadió este antibiótico (en forma de sal sódica) a una concentración final de 100 µg/ml tanto en medio sólido como líquido. Además, y en caso de realizarse la selección de recombinantes por ausencia de actividad β-galactosidasa, se añadieron al medio X-gal e IPTG a las concentraciones finales de 83 µM y 70 µM, respectivamente.

3.2 Medios para *Aspergillus nidulans*:

3.2.1 Medio completo (MCA).

Este medio fue desarrollado por Cove (1966). El medio contiene (para 1 litro): 20 ml de solución de sales, 10 ml de solución casaminoácidos, 10 g de D-glucosa, 2 g de baptopeptona y 1 g de extracto de levadura. Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6.8 con NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1,5% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave 30 minutos a 121°C. Antes de repartir el medio en placas de Petri se añadió la solución de vitaminas (ver sección 3.3.4; 10 ml de la solución de vitaminas/litro de medio) y, en caso de necesitarse, los requerimientos específicos de cada estirpe.

3.2.2 Medio mínimo(MMA).

Al igual que el anterior, este medio fue desarrollado por Cove (1966). Para 1 litro de medio se utilizaron 20 ml de solución de sales y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C. Para el medio mínimo sólido se añadió agar al 1,5% (p/v). Después de la esterilización y antes de ser repartido en las placas de Petri se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe, así como una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno apropiada. Este medio se utilizó para la selección y el mantenimiento de cepas.

Tanto el medio mínimo sólido como el completo sólido se tamponaron a pH ácido (medio ácido) añadiendo fosfato monosódico 5 M (estéril) a una concentración final 1 M; a pH alcalino (medio alcalino) añadiendo fosfato disódico 2 M (estéril) a una concentración final 300 mM y a pH neutro mediante adición de MES 1 M pH 6,5 a una concentración 20 mM final. Estos compuestos se añadieron al medio esterilizado y mantenido a una temperatura no superior a los 65°C.

Para el mantenimiento de las estirpes con mutaciones en los genes *paI* se utilizó medio ácido y para el de las estirpes *pacC*^o se adicionó al medio NaCl una concentración final 0,8 M, con objeto de mejorar la esporulación.

3.2.3 Medio de fermentación (MFA).

Este medio incluye como principal componente el CSL (Corn Steep Liquor). Se utilizaron los lotes Cerestar-2062 o Laisa-60015 a una concentración de 25 g/l. Antes de pesarse el CSL, se mezclaron bien las fases acuosa y sólida. Una vez pesado el CSL, se añadió el agua destilada y la solución de sales (20ml/l). Se agitó durante 20 minutos y se filtró a vacío con un papel de filtro. El pH se ajustó a valor 6,8 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno utilizadas en este trabajo, así como los suplementos termoestables requeridos por las distintas estirpes, se añadieron al medio antes de ser esterilizado. Los suplementos termosensibles, se añadieron una vez esterilizado.

Cuando se modificó el pH inicial del MFA, éste se tamponó a pH ácido (MFA ácido, pH 5,5) con NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 100 mM; a pH básico (MFA básico, pH 7,8) con Na₂HPO₄ 100 mM y a pH neutro (MFA neutro, pH 6,8) con NaH₂PO₄ 50 mM, Na₂HPO₄ 50 mM y NaCl 50 mM. El NaH₂PO₄ y el NaCl se añadieron de soluciones 5 M y el Na₂HPO₄ de una solución 2 M. Estas soluciones se añadieron al medio antes de su esterilización.

3.3 Soluciones y suplementos para medios de *A. nidulans*.

3.3.1 Solución de sales (Cove, 1966).

Para 1 litro (concentración 20X):

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Cloruro de potasio | 26 g |
| Sulfato de magnesio 7H ₂ O | 26 g |
| Fosfato dihidrógeno de potasio | 76 g |
| Solución de elementos traza | 50 ml |

3.3.2 Solución de casaminoácidos.

Hidrolizado de caseína 150 g/litro. Esterilizar en autoclave 121°C, 30 minutos. Se utilizó como solución 10X.

3.3.3 Solución de elementos traza.

Para 1 litro (preparado 10X):

| | |
|---|--------|
| Na ₂ B ₄ O ₇ | 40 mg |
| CuSO ₄ | 400 mg |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 800 mg |
| MgSO ₄ | 800 mg |
| Na ₂ MoO ₄ | 800 mg |
| ZnSO ₄ | 8 g |

3.3.4 Solución de vitaminas.

Para 1 litro (preparado como 10X)

| | |
|-----------------------|--------|
| Tiamina | 50 mg |
| Biotina | 10 mg |
| Ácido nicotínico | 100 mg |
| Pantotenato de calcio | 200 mg |
| Piridoxina-HCL | 50 mg |
| Riboflavina | 50 mg. |

Esta solución se esterilizó mediante filtración y se guardó a 4°C protegida de la luz.

3.3.5 Suplementos.

Vitaminas.

Estas se prepararon en agua y su esterilización fue mediante filtración (si no se menciona lo contrario). La concentración de estas disoluciones es 100X, excepto la de biotina que es 10000X.

Biotina: 100 mg/l.

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 200 mg/l. Autoclave.

Pantotenato de calcio: 200 mg/l.

MATERIALES Y MÉTODOS

Piridoxina-HCL: (Vitamina B6), 5 g/l.

Inositol: 1,2 g/l.

Aminoácidos.

(Disoluciones a una concentración 100X).

D-metionina: 14,9 g/l (100 mM). Esterilizada por Autoclave.

Arginina: 53 g/l (304.2 mM). Esterilizada por filtración.

Fuentes de carbono.

Se prepararon en agua destilada y se esterilizaron en el autoclave a 120°C, durante 30 minutos, salvo las excepciones que se indican.

La D-glucosa se preparó al 30% (p/v), la treonina al 10% (p/v) y el glicerol se esterilizó sin diluir. El etanol se utilizó directamente del envase al 100% (v/v)

El disacárido sacarosa se preparó en agua al 30% (p/v), y se esterilizó mediante la técnica del vapor fluente (a 100°C tres períodos de 20 minutos cada uno)

Fuentes de nitrógeno.

La única fuente de nitrógeno que se ha utilizado es tartrato amónico (5 mM). Se preparó a una concentración 500 mM (92 g/l, en agua destilada), 100X. Esta solución se esterilizó en el autoclave.

4 SOLUCIONES DE USO GENERAL.

En este apartado se recogen las soluciones más comunes utilizadas en el laboratorio.

- Agua tratada con DEPC: Se añadió 1 ml de dietilpirocarbonato (Sigma) a 1 litro de agua destilada. Se agitó durante 1 hora y se esterilizó en autoclave para destruir el DEPC.
- Cloroformo-alcohol isoamílico: Cloroformo, alcohol isoamílico 96:4 (v/v).
- Denhart (50X): Ficoll 400 (Sigma) 1% (p/v), PVP-40 (Sigma) 1% (p/v), BSA (Sigma) 1% (p/v).
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (49:49:2) (p/v). El fenol se preparó como se describe en Sambrook *et al.* (1989).
- MOPS (1X): MOPS 0,04 M, acetato sódico 0,01 M, EDTA 0,5 mM, pH 7,4. Se preparó como solución 10X.
- TAE (1X): Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Se preparó como solución 10X.
- Tampón de carga de electroforesis (10X): Ficoll (400) (Sigma) 30% (p/v), azul de bromofenol 0,2% (p/v), verde de xilencianol 0,2 % (p/v) (Merck), EDTA 40 mM, pH 8,0.
- TBE (1X): Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Se preparó como solución 10X.
- TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- TNE2: Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH. 8,0
- SSC: NaCl 0,15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7,0

5 PRODUCTOS RADIOACTIVOS.

Estos se adquirieron a Amersham. Para las hibridaciones DNA-DNA y DNA-RNA y los experimentos de EMSA se empleó [α - 32 P]-dCTP con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Las sondas de DNA se prepararon con el "kit" de iniciación al azar (random priming) de la marca Boehringer.

6 OTROS.

Los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica, generalmente de las marcas Sigma, Fluka, Merck, Probus y USB. Los componentes microbiológicos se adquirieron a Difco y Pronadisa. Las enzimas de restricción utilizadas procedían de Biolabs, Pharmacia o Boehringer. La fosfatasa alcalina y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* fueron adquiridos a Boehringer. La polinucleótido quinasa (PNK) del fago T4 fue de Boehringer. Las soluciones para P.C.R. y la polimerasa fueron las del sistema de amplificación "ExpandTM High fidelity P.C.R. System" de Boehringer.

7 MANIPULACIÓN DE *E. COLI*.

7.1 Preparación de células competentes.

Las células de *E. coli* se crecieron a 37°C con fuerte agitación hasta que la D.O. a 550 nm fue 0,45, momento en el que se recogieron mediante centrifugación a 2500 g durante 5 minutos a 4°C y el sedimento se suspendió en 80 a 100 ml del tampón TF1 (Hanahan, 1983) (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% (v/v)). El pH se ajustó a 5,8 con ácido acético 0,2 M y se esterilizó por filtración). La suspensión se dejó reposar 20 minutos en hielo. Las bacterias se centrifugaron de nuevo a 2500 g durante 5 minutos a 4°C y se suspendieron en 15 ml del tampón TF2 (RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15% (v/v), MOPS 10 mM, pH 7,0. Se esterilizó por filtración). Las células se repartieron en alícuotas de 200 μ l y se guardaron hasta su utilización a -80°C.

7.2 Transformación.

Normalmente se transformó *E. coli* con el DNA procedente de una mezcla de ligación y ocasionalmente con DNA plasmídico para la propagación de otros plásmidos recombinantes. Las células de *E. coli* competentes (ver sección anterior) se descongelaron a temperatura ambiente y se les añadió la solución de DNA (la mitad de una mezcla de ligación ó 1-50 ng de vector en TE). Las células con el DNA se incubaron a 0°C durante 20 minutos. La entrada del plásmido en la célula se indujo mediante incubación durante 1 minuto a 37°C seguida de una segunda incubación en hielo durante 1 minuto adicional. Las células se incubaron entonces durante 1 hora más a 37°C en 1 ml de LB, para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina de los vectores. Finalmente, se extendieron 200, 20 y 2 μ l de la mezcla de transformación sobre placas de LB con ampicilina (cuando se seleccionaron además los recombinantes por pérdida de actividad β -galactosidasa se incluyó en el medio X-gal e IPTG).

8 MANEJO DE *ASPERGILLUS NIDULANS*.

8.1 Medios de cultivo y mantenimiento de las cepas de *A. nidulans*.

El MCA sólido (ver sección 3.2.1 de materiales y métodos) se utilizó básicamente para el mantenimiento vegetativo de las cepas y para la obtención de grandes cantidades de conidios. Los cultivos en medio líquido se inocularon con suspensiones de conidios

8.2 Obtención de conidiosporas para inóculo de cultivos en medio líquido.

Todos los cultivos líquidos de este trabajo se establecieron inoculando directamente con conidiosporas. Los conidios se recogieron de cultivos de inóculo central en placas con MCA, incubadas durante 6 a 7 días a 37°C. Las esporas se recolectaron de la superficie de la colonia rascando con una espátula estéril y se resuspendieron en 40 ml de TWEEN 80 al 0,01% (v/v). Posteriormente se agitaron vigorosamente en un vórtex, se sedimentaron por centrifugación (5 minutos a 2000 g) y se resuspendieron en 40 ml de H₂O. El recuento de esporas totales se realizó al microscopio con un hemocitómetro (con contraste de fase). La solución de esporas se homogenizó por agitación y se inoculó directamente en el medio.

8.3 Condiciones de cultivo en medio líquido.

En todos los casos el inóculo fue de 2×10^6 conidiosporas/ml. En los experimentos en que después del cultivo en unas condiciones iniciales el micelio se transfirió a un medio fresco éste se recogió por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se secó parcialmente en condiciones estériles. Cuando la transferencia se hizo a varios medios distintos en cuanto a su composición, se transfirieron cantidades iguales de micelio en peso húmedo. Las estirpes se cultivaron en todos los casos, en agitación constante (250 r.p.m.) en un agitador orbital New Brunswick, a 37°C mientras no se indique lo contrario.

8.4 Transformación de *Aspergillus nidulans*.

La transformación se realizó esencialmente mediante el protocolo descrito por Tilburn *et al.* (1983). Se inocularon 2×10^6 conidiosporas en 400 ml de medio mínimo que contenían como fuente de nitrógeno tartrato amónico 5 mM y como fuente de carbono D-glucosa al 1% (p/v), suplementado con los requerimientos apropiados de la estirpe receptora. El cultivo se incubó durante 18 a 20 h a 25°C y el micelio se recolectó por filtración. Éste se lavó con un tampón que contenía: MgSO₄ 0,6 M, NaH₂PO₄ 10 mM pH 5,8. Para eliminar los restos de tampón de lavado, el micelio se prensó entre toallas de papel estériles. El micelio así prensado se resuspendió en 20 ml de tampón de protoplastos (MgSO₄ 1,2 M, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 5,8) frío por gramo de micelio. El tratamiento para destruir la pared celular se realizó con novozima (Sigma). Se utilizaron, por cada g de micelio, 2 ml de una solución de novozima al 0,1% (p/v) en tampón de protoplastos preparada en el momento y esterilizada por filtración con un filtro de 0,45 µm (Renner). La suspensión se preincubó durante 5 minutos a 0°C, pasados los cuales se añadieron 2 ml por g de micelio de una solución de 12 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma) en tampón de protoplastos. La suspensión de micelio se incubó a 30°C en un baño de agua con agitación

durante 1 a 2 h, comprobándose la formación de protoplastos al microscopio. Cuando el recuento de protoplastos mostró un valor aproximado de 10^8 protoplastos/ml se paró el tratamiento, agitándose la suspensión durante unos segundos para liberar los protoplastos atrapados por los restos de paredes del micelio. La suspensión se depositó en un Córrex estéril y se recubrió (sin mezclar) con un volumen igual de una solución de Sorbitol 0,6 M y Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 6000 r.p.m. en el rotor HB4 (Sorvall). Tras la centrifugación, los protoplastos, que forman una banda en la interfase, se recogieron con una pipeta Pasteur estéril y se diluyeron con 15 ml de ST (ST: Sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). La suspensión de protoplastos se concentró por centrifugación a 4000 r.p.m. y 4°C durante 10 minutos en el rotor HB4 y posterior resuspensión en 1 ml de ST. Los protoplastos se recogieron nuevamente por centrifugación a 13000 r.p.m. en una microcentrífuga durante 1 minuto a 4°C. Los restos de enzimas líticas se eliminaron lavando dos veces los protoplastos mediante resuspensión en 1 ml de STC (ST+Cl₂Ca 10 mM) y posterior centrifugación durante 1 minuto en la microcentrífuga. Después de estos lavados, la cantidad de protoplastos se contó al microscopio y éstos se concentraron por centrifugación y resuspensión en el volumen adecuado de STC para obtener 5×10^7 protoplastos/100 µl. A 200 µl de esta suspensión se le añadió el DNA transformante (de 1 a 3 µg) en menos de 20 µl. A la mezcla se adicionaron 50 µl de una solución de polietilenglicol (SPEG) (SPEG: PEG 6000 60% (p/v), Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, Cl₂Ca 10 mM) que se mezclaron con suavidad con la anterior suspensión. La mezcla se incubó 20 minutos en hielo y se añadió 1 ml adicional de SPEG mezclándose bien y manteniéndose la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los protoplastos se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µl de STC. Varias diluciones de esta suspensión se mezclaron con alícuotas de 3 ml de medio de selección de protoplastos que contenía agar al 0,25% (p/v) (mantenido líquido en un baño a 48°C). En todas las transformaciones el marcador selectivo fue *argB*, y el medio de selección (sin arginina) contenía glucosa al 1% como fuente de carbono, tartrato amónico 5 mM, como fuente de nitrógeno, y sacarosa 1 M como estabilizador osmótico, además de los requerimientos adecuados. El medio con los protoplastos se extendió sobre medio selectivo con agar al 1%, previamente solidificado en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Seguidamente, las placas se incubaron en posición invertida a 37°C creciendo los transformantes en este medio en los 3 o 4 días siguientes a la siembra. Para evitar la heterocariosis, se estriaron conidios de los transformantes en placas de medio sin arginina y se purificaron colonias aisladas.

8.5 Expresión génica regulada por el promotor de la alcohol deshidrogenasa (*alcA^P*).

A.nidulans puede utilizar etanol entre otras muchas fuentes de carbono. La alcohol deshidrogenasa I (codificada por *alcA*) es una de las enzimas necesarias para el metabolismo del etanol. En presencia de etanol u otros alcoholes primarios o secundarios, los genes *alc* (genes necesarios para el catabolismo del etanol), entre los que se encuentra *alcR*, se expresan. Este último gen codifica la proteína AlcR, que es el activador transcripcional específico de la ruta catabólica, y es responsable, mediante su unión a 3 sitios específicos en el promotor *alcA^P*, de la inducción de este promotor (Panozzo *et al.*, 1997). En presencia de una fuente de carbono favorable como la glucosa, la transcripción de los genes *alc* está severamente reducida (Felenbok y Kelly, 1996), debido a la acción de CreA, el represor

MATERIALES Y MÉTODOS

que media la represión por catabolito de carbono en *A. nidulans* (Bailey y Arst, 1975). CreA, ejerce su acción represora de la transcripción sobre el gen regulador de la ruta (*alcR*) y sobre genes estructurales como *alcA*, mediante su unión a sitios específicos (Kulmburg *et al.*, 1993; Mathieu y Felenbok, 1994).

El efecto sinérgico de la inducción de *alcA^P* mediada por AlcR (a través de sus tres sitios de unión en el promotor) hacen que este promotor sea uno de los más fuertemente inducibles de *A. nidulans*. El hecho de que esta inducción sea absolutamente dependiente de AlcR y de que en presencia de glucosa el gen *alcR* esté completamente reprimido (Lockington *et al.*, 1987), hacen que este promotor sea uno de los mejor regulables.

En este trabajo, todos los genes que se han expresado bajo el control del promotor *alcA^P*, se clonaron en el plásmido pALC (Fernández-Cañón y Peñalva, 1995; Fig. 17). Mientras que no se indiquen otras condiciones, se ha utilizado glucosa 0,05% (p/v), treonina 100 mM como condiciones de inducción del promotor y glucosa al 3% (p/v) como condiciones de represión.

8.6 TÉCNICAS DE GENÉTICA FORMAL.

Para favorecer la anastomosis entre hifas de dos estirpes parentales, los cruces se hicieron mediante inóculos puntuales de las dos estirpes en una misma placa de MCA suplementado con los requerimientos de ambas. Los parentales tenían distintos requerimientos nutricionales e, idealmente, distintos marcadores de color de las esporas para facilitar la identificación de los diploides vegetativos o los cleistotecios híbridos. Una vez establecida la anastomosis (2- 3 días de crecimiento a 37°C) se recortaron pequeñas porciones de medio sólido en las zonas donde las hifas estaban claramente fusionadas. Estas porciones se traspasaron a placas de MMA selectivo para alguno de los marcadores de ambas estirpes (condiciones de cultivo que solamente permiten el crecimiento de los heterocariotes) suplementado con glucosa al 1% como fuente de carbono y tartrato amónico 5 mM como fuente de nitrógeno. Las placas se incubaron a 37°C hasta que se formaron sectores heterocarióticos (normalmente 3 días).

Para el establecimiento de los diploides vegetativos se hicieron sucesivos pases de los sectores heterocarióticos a placas de MMA selectivo. El diploide (formado tras 3 o 4 pases) se distinguió por un mayor vigor de crecimiento y esporulación y por el color silvestre (verde) de las esporas, en los casos en que las estirpes parentales tenían marcadores de color de esporas (las mutaciones que afectan al color de las esporas son recesivas).

Para inducir la entrada en ciclo sexual, las placas de medio mínimo con los sectores heterocarióticos se sellaron, con el fin de someter al hongo a condiciones de anaerobiosis. Los cleistotecios se formaron a los 10-15 días de incubación a 37°C. Estos se recogieron de la placa con una aguja estéril, se depositaron en una placa de agar al 1,5% (p/v) solidificado, y se rodaron sobre el agar con ayuda de una aguja estéril hasta que se desprendieron las células de Hulle. Posteriormente cada cleistotecio se introdujo en un tubo Eppendorf con 100 μ l de H₂O estéril y se rompió contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Éstas se estiraron en una placa de MCA y se cultivaron 2 días a 37°C para comprobar si el cleistotecio era híbrido.

El genotipo de las ascosporas de los cleistotecios híbridos se analizó en placas de MMA selectivas para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

9 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las técnicas más generales, como la digestión del DNA con enzimas de restricción, tratamiento con fosfatasa alcalina, tratamiento con polinucleótido quinasa, así como la ligación de fragmentos de DNA se realizaron como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los tampones de reacción de estas enzimas fueron los preparados comercialmente por Boehringer.

9.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

El DNA plasmídico se aisló con los métodos comerciales de Promega ("Magic Minipreps") o de Boehringer ("High Pure Plasmid Isolation Kit"). Aproximadamente 10 ml de LB se inocularon con una colonia aislada de la correspondiente estirpe de *E. coli*. El cultivo se creció durante 16 h a 37°C. A continuación las células se recogieron por centrifugación (30 segundos a máxima velocidad en una microcentrífuga). Las células se lisaron y el plásmido se purificó siguiendo las instrucciones del correspondiente "kit" comercial.

9.2 Purificación de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa o de geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Estos últimos se utilizaron preferentemente para el aislamiento de oligonucleótidos y fragmentos de pequeño tamaño.

Para la purificación a partir de geles de agarosa se utilizó el preparado comercial GeneClean (Bio Inc.). Los fragmentos se separaron en geles de agarosa (frecuentemente del 0,8% (p/v)) en tampón 1XTAE y se identificaron mediante tinción con bromuro de etidio por comparación con las movilidades de los fragmentos del DNA del fago λ digerido con *Hind*III o de los fragmentos del DNA del fago Φ 29 digerido con *Hind*III. Para purificar el fragmento de interés se cortó el bloque de agarosa que lo contenía y se procedió según las indicaciones del fabricante del "kit".

La purificación a partir de geles de poliacrilamida se realizó según el protocolo de Maxam y Gilbert (1980). Los fragmentos de DNA se separaron en geles de 72X82X0,75 mm del equipo de electroforesis vertical Miniprotean-II (Bio-Rad). Las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida de la mezcla de polimerización del gel variaron en función del tamaño del fragmento (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA se tiñó con bromuro de etidio o con una solución saturada de azul de metileno (esta última evita la utilización de luz UV, que puede mellar el DNA). La porción del gel con el fragmento de interés se trituró en un tubo de 1,5 ml, añadiéndose 500 μ l de la solución de elución de Maxam y Gilbert (1980). Esta suspensión se incubó a 37°C durante 16 h con agitación. El DNA eluido se extrajo de los restos del gel filtrando la suspensión (por centrifugación) a través de fibra de vidrio. El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol puro durante 30 minutos a -80°C y se recogió por centrifugación. El precipitado se lavó con etanol al 80% (p/v), se secó a vacío y se resuspendió en TE pH 8,0. Posteriormente se determinó la concentración midiendo la D.O. a 260 nm.

9.3 Síntesis de oligonucleótidos.

Se sintetizaron 30 nmoles de los distintos oligonucleótidos con un sintetizador Beckman-Oligo 1000M (Beckman). Tras la síntesis de cada oligonucleótido, éste se trató con amoníaco a saturación para liberarlo del soporte sólido de síntesis y eliminar los bloqueos de las bases. Tras este tratamiento, se obtuvo un sedimento seco que se resuspendió en 200 µl de TE, calentándose periódicamente la suspensión a 65°C para facilitar el proceso. Una vez resuspendido el sedimento, la solución se filtró, mediante centrifugación a 2000 g durante 2 minutos, a través de dos columnas de sephadex G25 equilibradas con TE. Finalmente se determinó la concentración y pureza del oligonucleótido midiendo la D.O. de la solución a 260 y 280 nm (en la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo).

| Nombre | Secuencia |
|------------|---|
| alcsec2 | 5' - AGAGCCACAAACGAGCGG - 3' |
| pacC250-3' | 5' - CGCGAATTCCCTTCATACGACGCTTGG - 3' |
| pacC273-3' | 5' - CGGAATTCCCAGGGTCAAATTGTCG - 3' |
| pacCNLS-5' | 5' - TACGGATCCATGACCGGCCAGAGCCT - 3' |
| pacCNLS-3' | 5' - TGAGCACCATGGGGCCACGGCAGC - 3' |
| pacC173-5' | 5' - TCGGGATCCATGGCCTCGCCAGAGCCT - 3' |
| pacC173-3' | 5' - CCAGAAATCCCGACCGTACCAGGAC - 3' |
| pacC66-5' | 5' - CCTGGATCCATGGCGTCGTCAACATCT - 3' |
| GFP-5' | 5' - CAGGATCCCCCATGGTGAGCAAG - 3' |
| GFP-3' | 5' - CCGGATCCCTTGTACAGCTCGTC - 3' |
| PB1 | 5' - CGAAGCACTGCCAAGAGGCCTTCACAAGA - 3' |
| PB2 | 5' - CGTCTTGTGAAGGCCTTGGCAGTGCTT - 3' |

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

9.4 Apareamiento de oligonucleótidos sintéticos complementarios.

La sonda ipnA2 (sonda específica de PacC utilizada en todos los experimentos de EMSA; Espeso y Peñalva, 1996; Orejas *et al.*, 1995) se obtuvo mediante el apareamiento de los oligonucleótidos complementarios de banda simple PB1 y PB2. Estos oligonucleótidos se anillaron a partir de cantidades equimoleculares de cada uno de ellos en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM y espermidina 1 mM. Para ello la mezcla se calentó a 85°C durante 3 minutos, se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar los 40°C y posteriormente se enfrió a 4°C de forma rápida. El fragmento de doble banda se aisló en un gel de poliacrilamida (ver sección 9.2 de materiales y métodos) y la concentración se estimó midiendo la D.O. a 260 nm. (La equivalencia entre D.O. y masa se determinó utilizando el programa "Oligo" (Oligo-structure versión 3.4)

9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.).

Esta técnica se utilizó para la amplificación de fragmentos de DNA necesarios para la construcción de los distintos plásmidos que contenían *GFP* y distintas versiones de *pacC*. Se utilizó la mezcla de enzimas y las soluciones del "kit" comercial "Expand™ High fidelity P.C.R. System" de Boehringer y se siguieron las recomendaciones del fabricante en cuanto a la elaboración del cóctel para la P.C.R. Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Cetus (Gene Amp. P.C.R. System 2400). Éstas se realizaron con una cantidad de molde que no fue nunca superior a 5 ng, en presencia de 1,25 unidades de la polimerasa y de los oligonucleótidos cebadores a una concentración de 250 nM. El volumen de las reacciones fue siempre de 100 µl. Las condiciones de temperatura y ciclos se fijaron según los resultados del análisis de la estabilidad de apareamiento de los oligonucleótidos realizado con el programa de ordenador "Oligo" (Oligo structure versión 3.4). Como control negativo se llevó a cabo en todos los casos una reacción sin molde. Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en 1XTAE y se purificaron los fragmentos amplificados mediante GeneClean (Materiales y Métodos sección 9.2).

9.6 Aislamiento de DNA de *Aspergillus nidulans*.

Las conidiosporas de las cepas de interés recogidas con 5 ml de TWEEN 80, 0,01% (v/v) de media placa de inóculo central (MCA con los requerimientos apropiados) se inocularon en 100 ml de MMA con D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono, tartrato amónico 5 mM como fuente de nitrógeno y los demás requerimientos de la estirpe. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 16 h con una agitación de 250 r.p.m. en un incubador New Brunswick. El micelio se recogió por filtración, se congeló inmediatamente en hielo seco y se liofilizó durante al menos 16 h. Aproximadamente 400 mg del micelio liofilizado se trituraron con una varilla de cristal. Cuando se obtuvo una consistencia de polvo fino, éste se resuspendió en 500 µl de una solución que contenía HEPES 10 mM pH 6,9, sacarosa 0,5 M y EDTA 20 mM pH 8. Seguidamente se añadió SDS hasta una concentración del 0,1% (v/v). El lisado se incubó a 65°C durante 15 minutos, transcurridos los cuales se diluyó con 1 volumen de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM pH 8,0, mezclándose por inversión. A continuación, se extrajeron las proteínas del lisado (al menos dos veces) con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (49:49:2), centrifugándose después de cada extracción para separar la fase acuosa (que se recogió) de la orgánica (que se fue desechando). Tras la última extracción, se eliminaron los restos de fenol de la fase acuosa con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (96:4). A continuación, los ácidos nucleicos se precipitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol. El precipitado se recogió mediante centrifugación (5 minutos a la máxima velocidad en una microcentrífuga), se lavó con etanol al 80% (v/v), y se secó posteriormente a vacío. El precipitado se resuspendió en 100 µl de TE pH 8,0, y se eliminó el RNA por digestión con 1 µl de una solución (5mg/ml) de RNasa A (Boehringer) libre de DNasa, durante 30 minutos a 37°C. El DNA se precipitó de nuevo con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol y se recogió formando una madeja con la punta de una micropipeta. El DNA se lavó con etanol al 80%, y los restos de etanol se eliminaron a vacío. Finalmente se resuspendió en 100 µl de TE pH 8,0 y se midió la D.O. a 260 nm para calcular su concentración.

9.7 Análisis de fragmentos de DNA por el método de Southern.

Se utilizó el protocolo inicialmente descrito por Southern, (1975) ligeramente modificado. En todos los casos, 2,5 µg de los DNA aislados se digirieron toda la noche con *EcoRI* en un volumen de 40 µl. Los fragmentos resultantes de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en 1XTAE, dependiendo las condiciones de voltaje y la duración de la electroforesis del tamaño de los fragmentos que se pretendía analizar. El gel se irradió 5 minutos con un transiluminador de luz U.V. a una longitud de onda de 310 nm para fragmentar el DNA y facilitar su posterior transferencia. El DNA se desnaturalizó por inmersión del gel durante 45 minutos en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M, con agitación. El gel se lavó con agua destilada y se neutralizó en una solución de NaCl 3 M, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) en la que se mantuvo 45 minutos en agitación. El DNA se transfirió por capilaridad y durante toda la noche a una membrana de nitrocelulosa (15 x 14,5 cm) previamente hidratada con agua y equilibrada con 2 X SSC (se utilizaron membranas BA85, 0,45 µm (Schleicher & Schuell) o de 0,2µm (Bio-Rad)). Terminada la transferencia, la membrana se lavó con 2XSSC y se incubó 2 horas a 80°C para fijar el DNA al soporte de nitrocelulosa. El filtro se equilibró con 2XSSC y se prehibridó (en un horno de hibridación Red Roller II (Pharmacia)) durante 3 horas a 42°C con 30 ml de una solución que contenía 5XSSC, 5XDenhart's, formamida al 50% (v/v) y SDS al 0,1% en presencia de 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado. Tras la prehibridación, se añadió la sonda desnaturalizada (15 minutos a 95-100°C seguidos de 3 minutos a 0°C) a la solución de prehibridación y la membrana se incubó 20 horas más a 42°C. El filtro se aclaró con 2XSSC, SDS 0,1% (p/v) y se lavó 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a 42°C. Posteriormente se inició una serie de lavados con 0,2XSSC, SDS 0,1% (p/v) de 15 minutos de duración. El primer lavado se hizo a 42°C y los siguientes a una temperatura cada vez mayor (incremento de 5°C entre los sucesivos lavados), comprobándose después de cada lavado la radiactividad de fondo de la membrana con un contador Geiger. Una vez que no se detectó radiactividad de fondo, se interrumpieron los lavados, se envolvió el filtro en plástico transparente y se expuso con una película Kodak (XO-MAT) en presencia de una pantalla amplificadora (Dupont, High light plus) a -80°C.

9.8 Aislamiento de RNA de *A. nidulans*.

El micelio (2 g) del correspondiente cultivo, recogido a través de un Miracloth estéril, se congeló inmediatamente en nieve carbónica y se liofilizó durante un mínimo de 16 horas. Posteriormente se trituró con una varilla de vidrio estéril hasta alcanzar una consistencia de polvo fino, se mezcló con 10 ml de clorhidrato de guanidina 6 M, acetato sódico 20 mM pH 5,0, DTT 0,1 mM y se incubó 10 minutos en hielo. La mezcla se vertió en tubos Córax de 15 ml libres de RNasas y se centrifugó en frío (4°C) durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. en un rotor SS34 (Sorvall). El sobrenadante se decantó cuidadosamente en tubos Córax estériles de 30 ml libres de RNasas y los ácidos nucleicos se precipitaron con 0,5 volúmenes de etanol durante 45 minutos a -20°C. El precipitado se recogió por centrifugación (mismas condiciones), se resuspendió en 2 ml de clorhidrato de guanidina 6 M, acetato sódico 20 mM pH 7,0, DTT 1 mM y el RNA se precipitó con 0,5 volúmenes de etanol durante 1 hora a -20°C. De nuevo, se recogió el precipitado por centrifugación (en iguales condiciones a las ya descritas), se resuspendió en 1 ml de EDTA 20 mM pH 8 y el RNA se volvió a precipitar con 3 volúmenes de acetato sódico 4 M pH 6

durante 1 hora a -20°C . El precipitado se recogió por centrifugación a 12000 r.p.m. en una microfuga refrigerada (4°C) durante 15 minutos y se resuspendió en 1 ml de H_2O tratada con DEPC. El RNA se volvió a precipitar con 2,5 volúmenes de etanol y acetato sódico 30 mM pH 5 durante 1 hora a -20°C , se recogió por centrifugación (4°C , 10000 r.p.m., 15 minutos en una microfuga) y se lavó 3 veces con etanol al 80% mediante resuspensión y posterior centrifugación (4°C , 10000 r.p.m., 15 minutos). Tras el último lavado, el precipitado se secó (a vacío), se resuspendió en 1 ml de H_2O tratada con DEPC, y la solución se centrifugó en una microfuga refrigerada (4°C , 10000 r.p.m., 20 minutos). El sobrenadante obtenido tras esta última centrifugación (que contiene el RNA disuelto) se utilizó para los ensayos de northern.

9.9 Análisis del RNA por el método de northern.

El RNA total se separó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído, según el protocolo descrito por Thomas (1980). Las muestras (10 μg de RNA total) se prepararon en un volumen de 25 μl de 50% (v/v) de formamida, 5% (v/v) de formaldehído y 1xMOPS y se desnaturalizaron a 65°C durante 15 minutos. Posteriormente se enfriaron en hielo, se les añadió 3 μl de tampón de carga y se cargaron en un gel (15x14,5 cm) de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído al 18% (v/v) y 1xMOPS. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 6 voltios/cm hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel. El gel se tiñó con bromuro de etidio. Una vez eliminado el exceso de bromuro de etidio con sucesivos lavados con H_2O , se fotografió junto con una regla fluorescente (utilizando un transiluminador con luz U.V.) y se transfirió el RNA a una membrana de nitrocelulosa (BA85, 0,45 μm (Schleicher & Schuell)) que previamente fue hidratada con H_2O y saturada con 20xSSC (10 minutos a temperatura ambiente). La transferencia se hizo por capilaridad y durante toda la noche. Posteriormente el RNA se fijó incubando la membrana durante 2 horas a 80°C . La membrana se empañó con 2xSSC y se prehibridó 4 horas a 42°C en 30 ml de una solución de formamida al 50% (v/v), 5xSSC, 5xDenhardt's, fosfato sódico 5 mM pH 6,5 y DNA de esperma de salmón sonicado (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La hibridación con la sonda radiactiva (24h a 42°C en un volumen de 30 ml) se realizó en formamida al 50% (v/v), con una solución de sulfato de dextrano al 30% (v/v) (133,3 g/l de sulfato de dextrano, 5xSSC, fosfato sódico 50 mM pH 6,5 y 2,5xDenhardt's) y DNA de esperma de salmón sonicado (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La sonda radiactiva se añadió a la solución de hibridación una vez desnaturalizada (10 minutos a 95°C) y enfriada en hielo. Tanto la prehibridación como la hibridación se hicieron en un horno de hibridación Red Roller II (Pharmacia).

Terminada la hibridación el filtro se lavó de igual forma a la descrita para el método de Southern (ver sección 9.7 de materiales y métodos), se envolvió en plástico transparente y se expuso bien a una película sensible a radiactividad en presencia de una pantalla amplificadora o a una pantalla del Phosphorimager con objeto de proceder a la Cuantificación de la radiactividad presente en cada banda.

9.10 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.

9.10.1 Marcaje de sondas para análisis por los métodos de Southern y northern.

Para el marcaje de estas sondas se utilizó el sistema de iniciación al azar ("Random priming", Feinberg y Vogelstein, 1984) comercializado por Boehringer, siguiendo el protocolo recomendado por el

MATERIALES Y MÉTODOS

fabricante. Se utilizaron 25 ng de fragmento aislado por GeneClean a partir de geles de agarosa (ver sección 9.2 de materiales y métodos). En el marcaje de sondas para Northern se utilizaron 50 μCi de α - ^{32}P -CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) y para las de Southern se emplearon 20-30 μCi . Una vez marcada, la sonda se purificó pasándola por una columna de Sephadex-G50 equilibrada con TNE2 que se centrifugó durante 2 minutos a 2000 g. Se empleó un fragmento *EcoRI* de 2,3 kb del plásmido pJB2 (Tilburn *et al.*, 1995) para detectar el transcrito de *pacC*; un fragmento *EcoRV-HindIII* de 1,1 kb del plásmido pCiAnH2 (Ramón *et al.*, 1987) para detectar el transcrito de *ipnA* y un fragmento *NcoI-KpnI* de 0,83 kb del gen *actA* (Fidel *et al.*, 1988) para detectar el transcrito de actina. Para la detección del gen *argB* por la técnica Southern se utilizó un fragmento *XbaI* de 3,3 kb del plásmido pAN923-41A, que contiene el gen *argB*.

9.10.2 Marcaje terminal de fragmentos para experimentos de EMSA.

La única sonda empleada en los experimentos de EMSA en esta tesis ha sido la sonda *ipnA2* (Espeso y Peñalva, 1996; Orejas *et al.*, 1995) específica de PacC. Para el marcaje de esta sonda (que tiene los dos extremos 5' protuberantes) se utilizó la técnica de relleno de extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la DNA pol. I de *E. coli*. En todos los casos se marcaron 30 ng de fragmento con 20 μCi de α - ^{32}P -CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) y dATP, dTTP y dGTP a una concentración 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl_2 10 mM, DTT 1 mM y 25 μg de BSA, en un volumen final de 20 μl y en presencia de 1 u. de DNA polimerasa Klenow. Posteriormente se añadieron 12,5 μmoles de dCTP no radiactivo y se continuó la reacción durante 10 minutos adicionales. La reacción se paro añadiendo 1 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0 y el volumen se llevó a 100 μl con TE pH 8,0. Finalmente la sonda se purificó pasándola a través de una columna de 1 ml de Sephadex-G50 equilibrada con TE pH 8,0. Normalmente se obtuvieron valores de actividad específica del orden de $1\text{-}5 \times 10^6$ c.p.m./pmol.

9.11 Secuenciación automática de DNA.

Para la secuenciación de los fragmentos de DNA clonados en los distintos plásmidos, se utilizó la estrategia de "primer walking" descrita por Strauss *et al.* (1986). Se utilizó la enzima FS Amplitaq DNA polimerasa para llevar a cabo las reacciones de amplificación por P.C.R. y los terminadores marcados fluorescentemente del kit "ABI PRISM™" (Perkin Elmer). Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos universales "forward" y "reverse" del fago M13 o bien oligonucleótidos correspondientes a secuencias flanqueantes de los fragmentos a secuenciar. Los productos de la reacción se resolvieron utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer) y las secuencias se analizaron con los programas Chromas (versión 1.43) y PcGene.

9.12 Cuantificación de radiactividad.

La radiactividad en geles secos de poliacrilamida o en membranas de nitrocelulosa se cuantificó utilizando el aparato "Phosphorimager" y el programa informático de análisis y cuantificación de señales "Image-quant" (Molecular Dynamics).

9.13 Preparación de extractos totales de proteínas de *A. nidulans*.

Tras el cultivo correspondiente, el micelio se recogió por filtración y se lavó con abundante agua destilada estéril. De 2 a 4 g de micelio escurrido se resuspendieron en 40 ml de tampón de lisis (HEPES 25 mM pH 7,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10% (v/v), DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 1 μM, leupeptina 0,6 μM) y se lisaron (a 4°C) con perlas de vidrio (Braun, 0,45-0,5 mm) en un desintegrador mecánico Braun MSK (se aplicaron 3 pulsos de 20 segundos y 3 de 15 segundos a la máxima potencia). Al lisado se le añadió sulfato amónico 3,8 M (pH 7,5 con KOH) hasta una concentración final 0,4 M y se mantuvo 30 minutos a 0°C en agitación para extraer las proteínas. Posteriormente se sedimentaron los restos celulares y el DNA de alto peso molecular mediante centrifugación a 100000 g durante 1 hora a 2°C y se recogió el sobrenadante. Para precipitar las proteínas de este último, se añadió sulfato amónico al 70% de saturación y la solución se mantuvo 45 minutos en agitación a 0°C. El precipitado se sedimentó por centrifugación a 10000 g durante 20 minutos a 2°C y una vez descartado el sobrenadante se resuspendieron las proteínas en 2,5 ml de tampón A100 (HEPES 25 mM pH 7,9, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 20% (v/v), KCl 100 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 1 μM, leupeptina 0,6 μM). Los restos de sulfato amónico se eliminaron pasando la solución de proteína a través de una columna PD-10 (Pharmacia) equilibrada con tampón A100. Finalmente se valoró la concentración de proteína obtenida por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como patrón y reactivos de la casa Bio-Rad.

9.14 Fraccionamiento subcelular de *A.nidulans*.

Se utilizó un protocolo basado en el descrito por Van Heeswijck *et al.* (1991), que permite obtener las fracciones nuclear y citoplásmica. Entre 7 y 10 g de micelio lavado (H₂O destilada estéril) y escurrido se resuspendieron en 40 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Sorbitol 1M, Ficoll (tipo 400) 7% (p/v), glicerol 20% (v/v), acetato magnésico 5 mM, EGTA 5 mM, CaCl 3 mM, DTT 3 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 2 μM) y se lisaron (a 4°C) con perlas de vidrio (Braun, 0,45-0,5 mm) en un desintegrador mecánico Braun MSK (se aplicaron 3 pulsos de 20 segundos y 3 de 15 segundos a la máxima potencia). El lisado se vertió en un vaso de precipitados de 500 ml, se mezcló a homogeneidad, mediante agitación suave y en frío, con 80 ml de tampón B (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glicerol 10% (v/v), acetato magnésico 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,25 mM) y se dejó reposar en hielo durante unos minutos (hasta que las perlas de vidrio sedimentaron). Para eliminar los restos celulares del homogenizado, este se depositó cuidadosamente en tubos Córax de 30ml sobre 0,6 volúmenes de una mezcla 1:1,7 de los tampones A y B (se formaron dos fases) y se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 7 minutos a 4°C en un rotor HB4. La fase inferior, en la que estaban sedimentados los restos celulares, se desechó, recogiendo únicamente la fase superior. Esta se depositó cuidadosamente en tubos Córax de 30ml que contenían 5 ml de tampón C (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, sacarosa 1 M, glicerol 10% (v/v), acetato magnésico 5 mM, EGTA 5 mM) formándose nuevamente 2 fases. Tras centrifugar a 7000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C en un rotor HB4, los núcleos sedimentaron en el fondo del tubo, la fracción microsomal se localizó en la interfase, y la fracción citoplásmica se localizó en la fase superior. Se recogió la fracción citoplásmica cuidadosamente (utilizando una pipeta), se descartaron la fracción microsomal y el sobrenadante de la fase inferior, y el sedimento nuclear (fracción nuclear) se resuspendió en 1 ml de

tampón A50 (ver sección anterior). Posteriormente se obtuvieron extractos proteicos de las fracciones nuclear y citoplásmica. Para ello, en ambos casos las proteínas se extrajeron con sulfato amónico 0,4 M según el protocolo de extracción de proteínas ya descrito (ver sección anterior) y en el caso de la fracción citoplásmica se continuó este protocolo hasta el final. En el caso de la fracción nuclear, tras eliminar el DNA de alto peso molecular y los restos nucleares por centrifugación a 100000 g, la solución de proteína (sobrenadante) se dializó en frío con varios cambios de tampón A100 (ver sección anterior) y este extracto así obtenido fue el utilizado en los experimentos de EMSA y *western*. Paralelamente al fraccionamiento subcelular se obtuvo, en todos los casos, un extracto total a partir de una muestra de 4-5 g de micelio procedente del mismo cultivo.

9.15 Inmunodetección de proteínas por la técnica de *western*.

En todos los casos el análisis de proteínas por esta técnica se hizo a partir de 100 µg del extracto proteico de interés. Las proteínas se precipitaron con TCA al 10% (v/v) durante 10 minutos a 0°C y el precipitado se recogió por centrifugación (5 minutos, 4°C, 13500 r.p.m. en una microfuga refrigerada). Éste se lavó una vez con etanol:éter 1:1 (v/v), una segunda vez con etanol/éter 1:3 (v/v) y, tras eliminar el exceso de éter a vacío, se resuspendió en 50 µl de tampón de ruptura (Tris-HCl 625 mM pH 6,8, SDS 2%, (p/v) mercaptoetanol 5% (v/v), urea 6 M y azul de bromofenol a una concentración sin determinar). Las proteínas se desnaturalizaron 5 minutos a 100°C, se enfriaron en hielo y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, según el protocolo descrito por Laemmli (1970). En todos los casos se cargó en uno de los carriles 10µl de marcadores de bajo peso molecular preteñidos (Bio-Rad). Se utilizó un gel separador precedente de poliacrilamida al 11% (acrilamida:bisacrilamida 40:1) en Tris-HCl 0,325 M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), y persulfato amónico al 0,125% (p/v). Como gel concentrador se utilizó un gel del 3% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 40:1) en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1% (p/v), TEMED 0,01% (v/v) y persulfato amónico al 0,5% (p/v). La electroforesis se realizó en un tampón Tris-glicina 0,025 M pH 7,5 con SDS al 0,1% (p/v) en cubetas del sistema Miniprotean II (Bio-Rad) y en geles de 72x80x1,5 mm. Finalizada la electroforesis los geles se empaparon durante 20 minutos (a temperatura ambiente) en tampón de electrotransferencia (TEL) (Tris 25 mM, glicina 193 mM, metanol al 20% (v/v)) y las proteínas se transfirieron durante 3 horas y a 0°C a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham) que previamente había sido hidratada con H₂O y equilibrada con TEL (20 minutos). La transferencia se hizo por electroforesis (se utilizó un voltaje constante de 100 voltios), a 0°C, en un transferidor de inmersión "Mini Trans-Blot transfer cell" (Bio-Rad), en presencia de TEL.

Finalizada la transferencia, las membranas se aclararon con TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM), se lavaron 10 minutos en este mismo tampón, y se incubaron 14 h con 50 ml de solución de bloqueo (5% de leche desnatada en TBS). Después del bloqueo, las membranas se lavaron (dos aclarados, un lavado de 15 minutos y dos lavados de 5 minutos) con TTBS (tween 20 al 0,05% (v/v)) en TBS) y se incubaron durante 4 horas con 15 ml de una dilución del primer antisuero en TAC (leche desnatada al 1% en TTBS). Posteriormente, se repitió el lavado con TTBS y las membranas se incubaron durante 1 hora con 15 ml de una dilución del segundo antisuero, (que en todos los casos estaba unido a la peroxidasa del rábano ("Horseradish peroxidase")) en TAC. Todas las incubaciones se

hicieron a temperatura ambiente, en agitación, y en cajas de Plástico de 9x9x2 cm. Después de la incubación con el segundo anticuerpo, la membrana se lavó con TTBS (2 aclarados, 1 lavado de 15 minutos y 4 lavados de 5 minutos) y la actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham) (se siguieron las instrucciones del fabricante) y exponiendo posteriormente la membrana (envuelta en un plástico transparente) con películas Kodak X-OMAT.

9.15.1 Antisueros utilizados.

Antisuero contra el dominio de unión al DNA de PacC: antisuero obtenido en ratas contra la proteína PacC(5-265) fusionada por su extremo amino terminal a una cola de histidinas. La proteína se expresó en *E. coli* y se purificó mediante una columna de afinidad conteniendo níquel. Posteriormente se desnaturizó en un tampón que contenía SDS al 2% (p/v) y β -mercaptoetanol al 5% (v/v) y se utilizó para inmunizar al animal. Este antisuero se utilizó a una dilución 1/2000. Como antisuero secundario se utilizó un antisuero policlonal de oveja (contra inmunoglobulinas de rata) ligado a peroxidasa (Amersham). Este anticuerpo se utilizó en una dilución 1/2000. Antisuero anti GFP: se utilizó un antisuero comercial policlonal de conejo (Clontech). Este antisuero se utilizó a una dilución 1/3000. Antisuero contra la hexoquinasa de *S. cerevisiae*: Antisuero policlonal de conejo inmunizado con hexoquinasa de *S. cerevisiae* (Chemicom). Se utilizó a una dilución 1/20000. En estos dos últimos casos, se utilizó un antisuero policlonal de cabra (contra inmunoglobulinas de conejo) ligado a peroxidasa (Sigma) como antisuero secundario, a una dilución 1/3000.

9.16 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

Se utilizó un protocolo basado en el descrito por Pérez-Estebán *et al.* (1993). En todos los casos las reacciones de unión proteína-DNA se llevaron a cabo durante 30 minutos a 0°C en un volumen final de 20 μ l. Se utilizaron 5 μ g del extracto proteico de interés, 0,3 ng de la sonda ipnA2 específica de PacC y 3 μ g del competidor inespecífico poli(dI-dC) (Farmacia). La reacción de unión, que se inició al añadir el extracto proteico, se realizó en un tampón que contenía Hepes-KOH 25 mM pH 7,9, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, DTT 1 mM y glicerol al 20%. Finalizada la reacción, se analizó el cambio de movilidad electroforética de la sonda en un gel de poliacrilamida al 5% (acrilamida:bisacrilamida 40:1) no desnaturizante en 0,5xTBE. La electroforesis se realizó a 4°C en una cubeta vertical Sturdier SE400 (Hoeffer) en un gel de 14x16x1,5 cm. El gel se recorrió durante 30 minutos a 200 voltios y la electroforesis se llevo a cabo a este mismo voltaje durante 2 horas y 30 minutos. Finalizada ésta, el gel se secó (1 hora a 80°C) y se expuso a una película sensible a la radiactividad en presencia de una pantalla intensificadora. Alternativamente, el gel se expuso a una pantalla del Phosphorimager con objeto de cuantificar la radiactividad presente en las distintas bandas.

El EMSA en condiciones de alta resolución se hizo de igual forma a la descrita, pero con las siguientes variaciones: se utilizó un gel de poliacrilamida del 8%, el tamaño del gel fue de 14x32x1,5 cm y la duración de la electroforesis fue de 6 horas. En este tiempo el Verde de xilencianol migró hasta 3 cm antes del final del gel.

10 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.

Previamente a la observación microscópica las muestras de micelio se lavaron 3 veces con 4 volúmenes de H₂O destilada para eliminar restos sólidos del MFA que pudieran interferir con la detección de la fluorescencia. Cuando solamente se detectó la fluorescencia debida a la GFP, las muestras, una vez lavadas, se observaron directamente. Las muestras en las que se localizaron los núcleos por tinción con DAPI, se fijaron y se tiñeron con este colorante antes de su observación. En este último caso, las muestras se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente con un volumen de formaldehído al 3,5% preparado en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,8 que contenía tritón X-100 al 0,2%. Posteriormente se sedimentó el micelio por centrifugación durante 3 minutos a 13000 r.p.m. en una microfuga, se retiró el fijador y la muestra se lavó dos veces con dos volúmenes de H₂O. Finalmente el micelio se resuspendió en un volumen de H₂O. La tinción con DAPI se llevó a cabo mezclando la muestra con un volumen de una mezcla de tinción que contenía 0,062 µg/ml de DAPI en glicerol al 50% (v/v).

Las muestras se observaron con un microscopio de luz transmitida y fluorescente Zeiss (Axioplan universal) utilizándose un ocular de 10 aumentos y objetivos de 40 o 100 aumentos, este último de inmersión. Para la detección de la fluorescencia emitida por la GFP se utilizaron filtros de excitación y emisión a 495 y 530 nm, respectivamente, y para la detección de la fluorescencia del DAPI filtros de excitación y emisión a 360 y 460 nm, respectivamente. Las fotografías se tomaron con una cámara digital CH250A (Photometrics) mediante el sistema informático de adquisición de imágenes IPLab Spectrum y fueron procesadas con el sistema informático Adobe Photoshop versión 4.0.

RESULTADOS

PARTE I

ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA DE PacC EN RESPUESTA A UN pH AMBIENTAL ALCALINO

1. Activación proteolítica de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino.

1.1 Relación precursor-producto entre el producto primario de traducción y la forma procesada de PacC.

El modelo de Orejas *et al.* (1995) establece que a un pH ambiental alcalino y como consecuencia de la transducción de la señal de pH ambiental mediada por los productos codificados por los genes *pac*, PacC se activa mediante la eliminación proteolítica de aproximadamente el 60% de los residuos a partir del extremo carboxilo terminal de la proteína. La forma procesada resultante, que contiene el dominio de unión al DNA, es una forma funcional capaz de activar la transcripción de genes "alcalinos" y de prevenir la transcripción de genes "ácidos".

Con objeto de establecer si realmente existe una relación precursor producto entre el producto primario de traducción y la forma procesada de PacC, así como de comparar la estabilidad de ambas formas de la proteína, se realizaron experimentos de expresión transitoria bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa (*alcA^P*) (Pu y Osmani 1995), tanto del producto primario de traducción como de una versión de la proteína similar a la forma procesada. Estos experimentos se basan en el hecho de que la actividad de este promotor puede ser controlada mediante la composición del medio de cultivo (Lockington *et al.*, 1985, Gwynne *et al.*, 1987, Waring *et al.*, 1989), de forma que la presencia en el medio de glucosa a una concentración igual o superior al 1% (p/v) reprime el promotor (represión mediada por el represor de amplio dominio *creA*), mientras que la presencia de etanol u otros alcoholes primarios o secundarios, como la treonina, lo inducen (inducción mediada por el regulador específico de la ruta, *alcR* (ver sección 8.5 de materiales y métodos)).

Los plásmidos p[*alcA^P::pacC(5-678)*] y p[*alcA^P::pacC(5-265)*], que dirigen la expresión del producto primario de traducción de *pacC* y de una versión similar a la forma procesada de la proteína, respectivamente (Fig. 18), fueron introducidos en una estirpe $\Delta pacC$ de *A. nidulans* mediante técnicas estándar de transformación, seleccionándose mediante la técnica de Southern transformantes con copias únicas de los respectivos plásmidos integrados en el locus *argB* (Fig. 19). Al igual que en este caso, y con el fin de evitar efectos posicionales, en todas las transformaciones de esta tesis se han dirigido los diferentes plásmidos al locus *argB*, habiéndose seleccionado transformantes con una única copia (en algunos casos dos) de la correspondiente construcción integrada en *argB*.

En los experimentos de expresión transitoria se ha utilizado medio de fermentación (MFA) (Espeso y Peñalva 1992), un medio complejo previamente utilizado por Orejas *et al.* (1995) en el estudio de la activación de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino, que fue tamponado a pH ácido (MFA ácido) con objeto de disminuir el procesamiento del producto

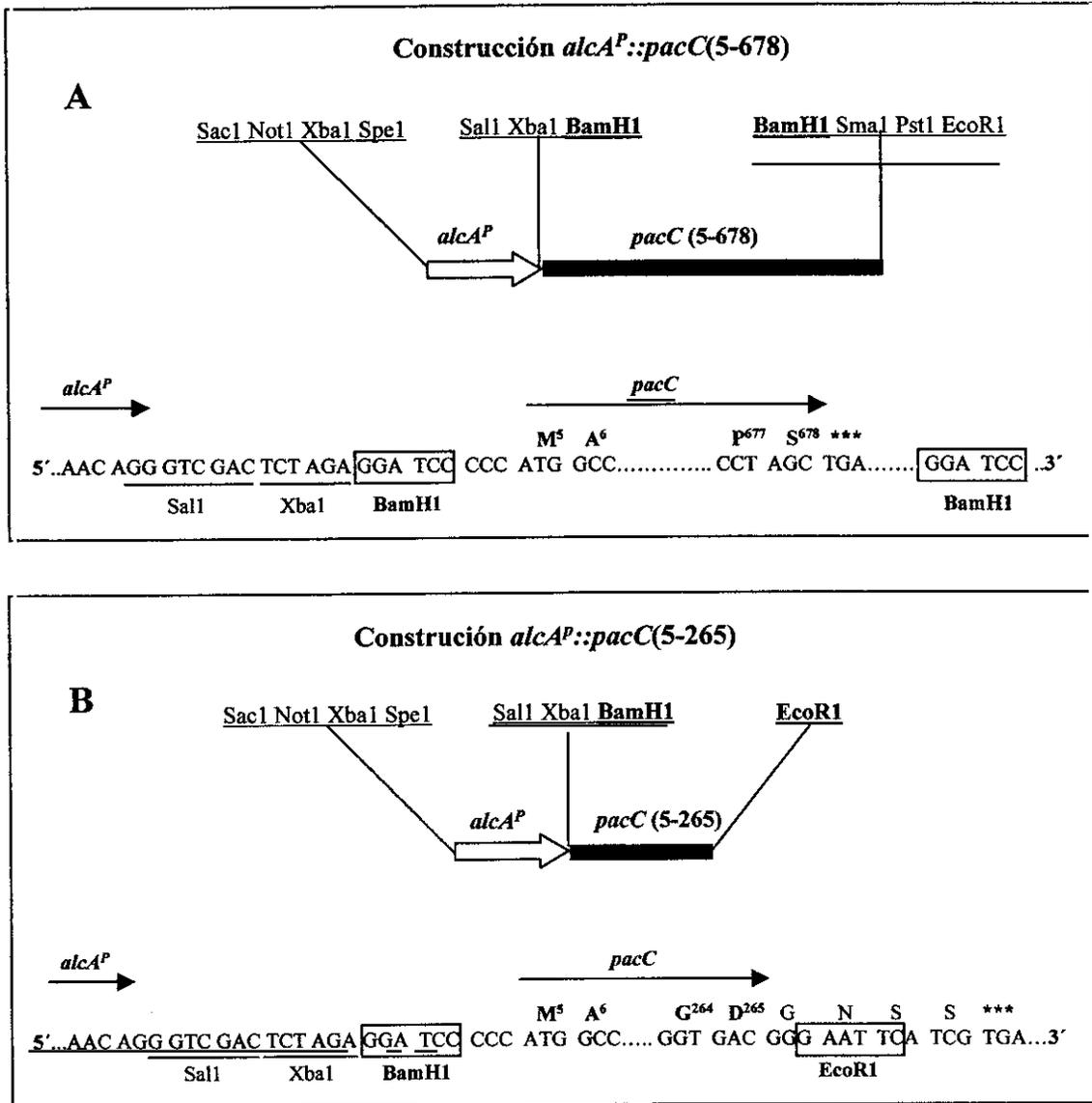


Figura 18. Descripción esquemática de los genes quiméricos *alcA^P::pacC(5-678)* (A) y *alcA^P::pacC(5-265)* (B). En negrita se muestran los sitios de restricción usados para el clonaje de estos dos alelos *pacC* en el plásmido pALC. En la parte inferior de los paneles se muestra la secuencia de nucleótidos de los extremos 5' y 3' de estos alelos *pacC*, la secuencia de unión al promotor *alcA^P* y la secuencia de aminoácidos resultante en los extremos amino y carboxilo terminal de las proteínas quiméricas.

primario de traducción al expresar PacC(5-678). Fernández-Cañón y Peñalva (1995) demostraron que en MFA suplementado con glucosa al 0.1% (p/v) (una concentración desrepresora para *alcA^P*) y treonina 100 mM (como inductor) se consiguen niveles elevados de expresión del *alcA^P*. Basándonos en estos resultados, se hizo un primer experimento con objeto de establecer condiciones óptimas de inducción y represión. El transformante con el transgén

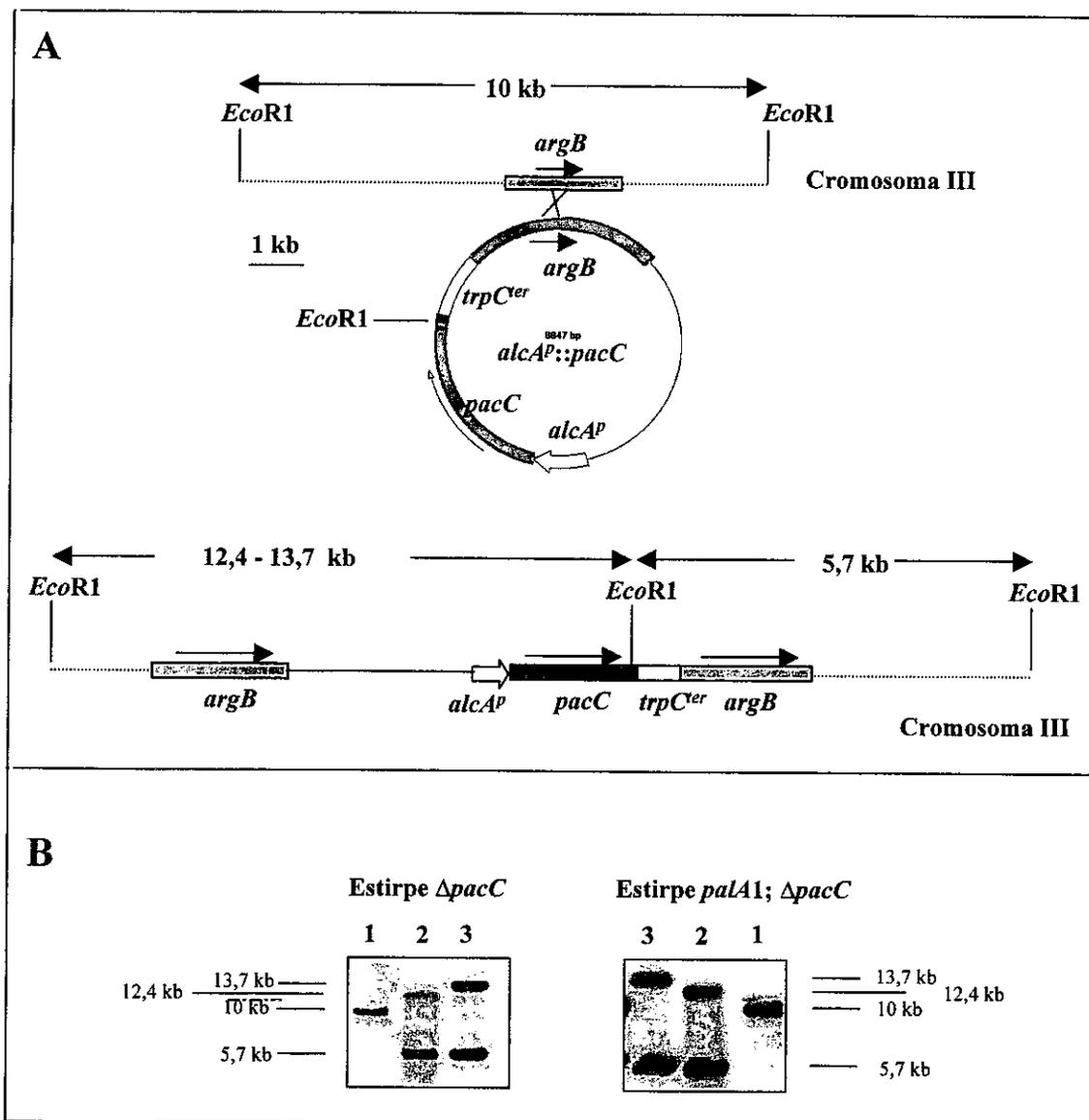


Figura 19. Caracterización de transformantes de las estirpes $\Delta pacC$ y $palA1; \Delta pacC$ con una única copia del plásmido $p[alcA^P::pacC(5-265)]$ o $p[alcA^P::pacC(5-678)]$ integrada en el locus $argB$. (A) Esquema de la integración de una única copia de un plásmido genérico $p[alcA^P::pacC]$ en el gen $argB$ (cromosoma III) de *A. nidulans*. Se indican los tamaños de los fragmentos de restricción detectados en el experimento de Southern (panel B de la figura) correspondientes a los sucesos de integración de $p[alcA^P::pacC(5-265)]$ o $p[alcA^P::pacC(5-678)]$ en $argB$. (B) Hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *EcoRI*) de los transformantes de las estirpes indicadas con las construcciones $p[alcA^P::pacC(5-265)]$ (2) o $p[alcA^P::pacC(5-678)]$ (3) con una sola copia del plásmido integrada en $argB$. Como control se emplearon los DNAs de las estirpes receptoras (1). La sonda es específica para $argB$.

$alcA^P::pacC(5-678)$ se cultivó durante 14 horas en MFA ácido suplementado con glucosa al 3% (p/v) (condiciones de represión). Partes iguales del micelio se transfirieron a dos matraces de MFA ácido suplementado con treonina 100 mM (condiciones de inducción). A uno de los

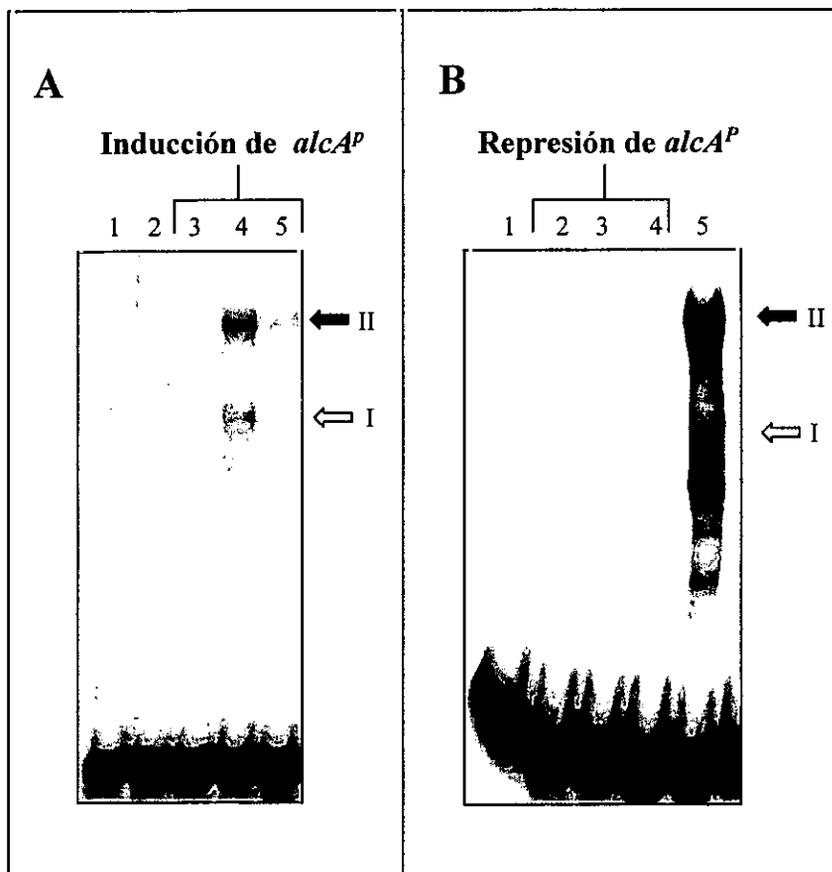


Figura 20. Establecimiento de condiciones óptimas de inducción y represión de *alcA^P* en MFA ácido. La estirpe recombinante *alcA^P::pacC(5-678)*; $\Delta pacC$ se cultivó 14h a 37°C en MFA ácido con glucosa al 3%(p/v) (condiciones represoras para *alcA^P*) como principal fuente de carbono. Partes iguales del micelio se transfirieron a matraces con MFA ácido suplementado con distintas fuentes de carbono y el micelio se cultivo durante 6 horas más. Se obtuvieron extractos proteicos de muestras de micelio recogidas tras las 14 de cultivo en glucosa al 3%(p/v) y a las 3 o 6 horas de cultivo en las nuevas condiciones que fueron analizados por EMSA utilizando la sonda ipnA2 específica de PacC. (A) Condiciones óptimas de inducción. 1) sonda libre. 2) glucosa 3%(p/v), 14 horas. 3) Treonina 100mM, glu 0.05% (p/v), 3 horas adicionales. 4) Treonina 100mM, glu 0.05% (p/v), 6 horas adicionales. 5) Treonina 100mM, glicerol 1% (v/v), 6 horas adicionales. (B) Condiciones óptimas de represión (en presencia de treonina 100mM como inductor). 1) sonda libre. 2) glucosa 3%(p/v), 14 horas. 3) Glucosa 3%(p/v), 6 horas adicionales. 4) Glucosa 3%(p/v), treonina 100mM, 6 horas adicionales. 5) Glu 0.05% (p/v), treonina 100 mM 6 horas adicionales.

matraces se le añadió glucosa al 0.05% (p/v), y al otro glicerol al 1% (v/v) (ambas condiciones son desrepresoras para *alcA^P*) cultivándose el micelio durante 6 horas más. El análisis por EMSA de PacC en extractos proteicos de estos micelios (Fig. 20A) mostró cómo en condiciones de represión no se detectó ningún complejo de retardamiento (carril 2), mientras que a las 6 horas de transferir el micelio a condiciones de inducción, tanto en presencia de glicerol al 1% (v/v) (carril 5) como en presencia de glucosa al 0.05% (p/v) (carril 4), se

detectaron dos complejos de retardamiento correspondientes al producto primario de traducción (complejo II) y a la forma procesada de PacC (complejo I), respectivamente, siendo los niveles de estos dos complejos claramente mayores en presencia de glucosa al 0.05% (p/v) a las 6 horas de inducción (a las tres horas de cultivo en estas últimas condiciones no se detectaron niveles apreciables de PacC (carril 3)). A la vista de estos resultados se decidió utilizar glucosa al 3% (p/v) como condiciones de represión (R) y glucosa al 0.05% (p/v) y treonina 100 mM durante 6 horas, como condiciones de inducción (I) en los experimentos de expresión transitoria dirigida por *alcA^P*. Estas condiciones de inducción/represión se han mantenido en todos los experimentos de esta tesis en los que se ha utilizado *alcA^P*. Con objeto de comprobar si en MFA ácido la glucosa a una concentración del 3% (p/v) era capaz de cerrar completamente el promotor, incluso en presencia de treonina 100 mM, se llevó a cabo un experimento igual al anterior, pero esta vez transfiriendo partes iguales del micelio crecido en condiciones de represión a tres matraces distintos con MFA ácido suplementados bien con glucosa al 3% (p/v) (condiciones de represión), glucosa al 3% (p/v) y treonina 100 mM (condiciones de represión-inducción), y glucosa al 0,05% (p/v) y treonina 100 mM (condiciones de inducción), respectivamente. La figura 20B muestra cómo solamente se detectaron niveles apreciables de PacC (mediante EMSA (complejos I y II)) en extractos proteicos correspondientes al cultivo en condiciones de inducción (carril 5), no detectándose PacC en ninguno de los otros dos extractos (carriles 3 y 4), lo que indica que incluso en presencia de treonina 100 mM la glucosa al 3% (p/v) cierra completamente el promotor *alcA^P*. Basándonos en estos resultados se decidió utilizar glucosa a esta concentración (3% (p/v)) para reprimir la expresión génica en los experimentos de expresión transitoria.

En estos experimentos, los dos transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ seleccionados (con los transgenes *alcA^P::pacC(5-678)* y *alcA^P::pacC(5-265)*, respectivamente) se cultivaron 14 horas en condiciones de represión y luego durante 6 horas más en condiciones de inducción. Transcurrido este tiempo, se restablecieron nuevamente las condiciones de represión (mediante adición al medio de glucosa al 3% (p/v)) y el micelio se cultivó en estas condiciones durante 6 horas más. Se tomaron muestras del micelio después del cultivo en condiciones de represión, después del cultivo en condiciones de inducción y a distintos tiempos después de haberse restablecido las condiciones de represión. La figura 21 (panel superior) muestra el análisis por EMSA de PacC en extractos proteicos de las muestras de micelio recogidas. Tras el cultivo en condiciones de represión, en ninguno de los dos transformantes se detectaron niveles apreciables de PacC (Fig. 21Ay B carriles 2). Tras las 6 horas de cultivo en condiciones de inducción, la expresión de PacC(5-678) dio lugar a la formación de dos complejos de retardamiento (complejos I y II) correspondientes a la forma procesada de PacC y al producto primario de traducción, respectivamente, siendo el complejo II mayoritario (Fig. 21A carril 3). Tras ser restablecidas las condiciones de represión se observó cómo los niveles del complejo II

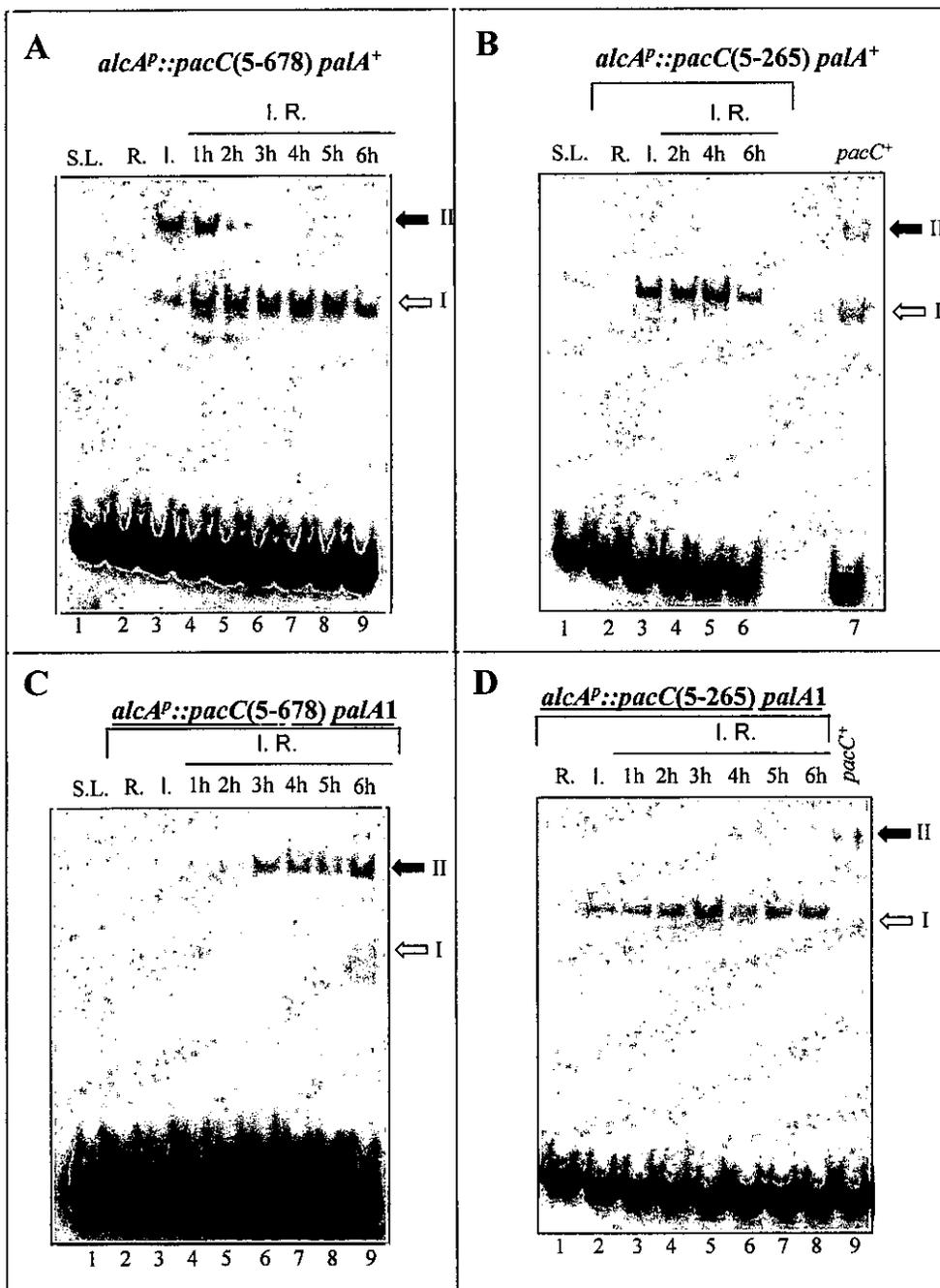


Figura 21. Experimentos de expresión transitoria con las proteínas PacC(5-678) y PacC(5-265). Transformantes con copias únicas de p[*alcA*^P::*pacC*(5-678)] y p[*alcA*^P::*pacC*(5-265)] integradas en el locus *argB* en los fondos genéticos *palA*⁺ y *palA1* (Fig. 19) se cultivaron durante 14 horas a 37°C en MFA ácido, en condiciones represoras para *alcA*^P y el micelio resultante se transfirió a MFA ácido fresco cultivándose durante 6 horas más en condiciones de inducción. Transcurrido este tiempo se restablecieron las condiciones de represión (mediante adición al medio de glucosa al 3% (p/v)) y el micelio se cultivó 6 horas más. Se tomaron muestras de micelio después del cultivo en condiciones de represión (R.), inducción (I.), y a distintos tiempos después de haber sido restablecidas las condiciones de represión (I.R.). Se prepararon extractos proteicos de las muestras recogidas que fueron analizados por EMSA. Como control, en los paneles B y D se muestran los complejos que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC*⁺) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% como única fuente de carbono y en los paneles A, B y C se muestra un carril (carril 1) en el que solamente se cargó sonda libre (S.L.) Las flechas blanca y negra indican los complejos proteína-DNA formados por la forma procesada y el producto primario de traducción PacC, respectivamente.

disminuyeron progresivamente, habiéndose reducido en más del 50% a las 3 horas (según la cuantificación de la radiactividad presente en cada complejo mediante Phosphorimager, resultados no mostrados). Simultáneamente, los niveles del complejo I aumentaron, aparentemente a expensas del complejo II, y solamente empezaron a disminuir a las 5 horas de haber sido restablecidas las condiciones de represión. Estos resultados indican que (en presencia de una ruta *pal* funcional) el producto primario de traducción de *pacC* es inestable debido a su procesamiento proteolítico para dar lugar a la forma procesada, más estable. La figura 21 B muestra cómo la proteína PacC(5-265) es una proteína notablemente más estable que el producto primario de traducción, de forma que los niveles del complejo formado por esta proteína (de movilidad electroforética ligeramente menor que la del complejo I) tras la inducción de su síntesis (carril 3) no empezaron a disminuir hasta 4 horas después de haber sido restablecidas las condiciones de represión (en este tiempo más del 80% del producto primario de traducción se había procesado) y solamente disminuyeron en un 50% a las 6 horas.

Con objeto de establecer si la ruta de los genes *pal* de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para el procesamiento de PacC, se hicieron los mismos experimentos de expresión transitoria en una estirpe de *A. nidulans* carente de esta ruta funcional. Para ello se obtuvo, mediante cruzamiento de dos estirpes apropiadas (ver sección 8.6 de materiales y métodos), una estirpe *palA1 argB2; ΔpacC* obteniéndose, posteriormente, de igual forma a la descrita anteriormente, transformantes de esta estirpe con copias únicas de los plásmidos p[*alcA^P::pacC(5-678)*] o p[*alcA^P::pacC(5-265)*] integradas en el *locus argB* (Fig. 19C). La figura 21C muestra como en este fondo genético se previno el procesamiento del producto primario de traducción de *pacC*, mientras que, como control, la estabilidad de la proteína PacC(5-265) no varió (Fig. 21D). Los resultados de estos experimentos de expresión transitoria establecen, por tanto, que la forma procesada de PacC proviene del procesamiento proteolítico del producto primario de traducción y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para que este procesamiento tenga lugar.

El análisis fenotípico de los distintos transformantes en medio sólido (Fig. 22) muestra cómo en un medio de cultivo ácido, tanto en condiciones de inducción como de represión para *alcA^P*, los transformantes crecen normalmente y, a diferencia de la estirpe *ΔpacC*, conidian normalmente, lo que indica que los niveles de PacC necesarios para la conidiación normal deben ser muy bajos, ya que en estas condiciones de cultivo PacC es indetectable por EMSA (Fig. 20). En condiciones de inducción, a pH alcalino, los transformantes con el transgén *alcA^P::pacC(5-265)* en los fondos genéticos *palA⁺* y *palA1* son indistinguibles. En ambos casos la expresión de PacC(5-265) suprime la sensibilidad a pH alcalino resultante de la mutación *ΔpacC*, lo que indica que el alelo *pacC(5-265)* es epistático (en condiciones de inducción) sobre la mutación *palA1*. Por el contrario, aunque la expresión de PacC(5-678) en un fondo genético

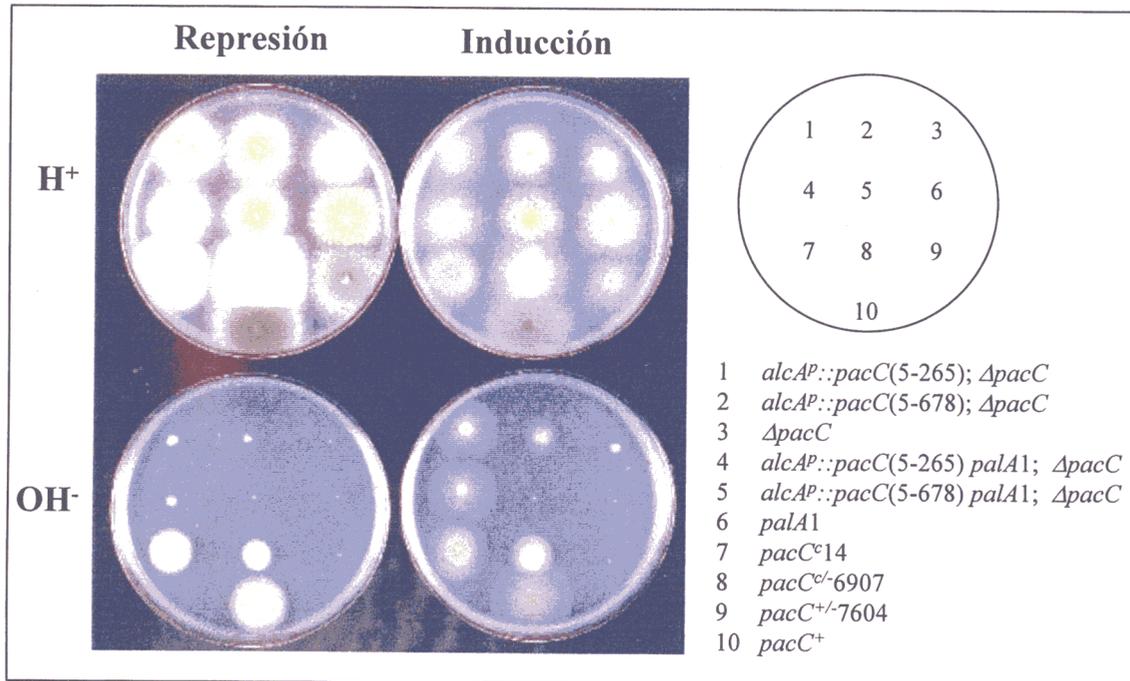


Figura 22. Análisis fenotípico en medio sólido de los transformantes de las estirpes $\Delta pacC$ y $palA1$; $\Delta pacC$ con los transgenes $alcA^P::pacC(5-678)$ y $alcA^P::pacC(5-265)$. Los transformantes, así como las estirpes control que se indican, se cultivaron durante 60 horas a 37°C en placas de medio mínimo tamponado a pH ácido (H^+) o alcalino (OH^-) y suplementado con treonina 100mM y glucosa al 0.05% (p/v) (condiciones de inducción para $alcA^P$) o glucosa al 3% (p/v) (condiciones de represión) como fuentes de carbono.

$palA^+$ suprime la sensibilidad al pH ambiental alcalino resultante de la mutación $\Delta pacC$ (aunque en menor medida que la expresión de $PacC(5-265)$), en un fondo $palA1$ el fenotipo es indistinguible del fenotipo de una estirpe $palA1$ (en la sección 3.3 de resultados se planteará una posible explicación al hecho de que la inducción de $pacC(5-678)$ en un fondo genético $palA^+$ resulte en un cierta sensibilidad al pH ambiental alcalino). En condiciones de represión para el promotor, si bien todos estos transformantes son muy sensibles al pH alcalino, posiblemente el ligero "escape" del promotor permite que las cepas $palA^+$ y $palA1$ con el transgén $alcA^P::pacC(5-265)$ y la cepa $palA^+$ con $alcA^P::pacC(5-678)$ sean ligeramente más resistentes que la estirpe $\Delta pacC$.

RESULTADOS. PARTE I

disminuyeron progresivamente, habiéndose reducido en más del 50% a las 3 horas (según la cuantificación de la radiactividad presente en cada complejo mediante Phosphorimager, resultados no mostrados). Simultáneamente, los niveles del complejo I aumentaron, aparentemente a expensas del complejo II, y solamente empezaron a disminuir a las 5 horas de haber sido restablecidas las condiciones de represión. Estos resultados indican que (en presencia de una ruta *pal* funcional) el producto primario de traducción de *pacC* es inestable debido a su procesamiento proteolítico para dar lugar a la forma procesada, más estable. La figura 21 B muestra cómo la proteína PacC(5-265) es una proteína notablemente más estable que el producto primario de traducción, de forma que los niveles del complejo formado por esta proteína (de movilidad electroforética ligeramente menor que la del complejo I) tras la inducción de su síntesis (carril 3) no empezaron a disminuir hasta 4 horas después de haber sido restablecidas las condiciones de represión (en este tiempo más del 80% del producto primario de traducción se había procesado) y solamente disminuyeron en un 50% a las 6 horas.

Con objeto de establecer si la ruta de los genes *pal* de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para el procesamiento de PacC, se hicieron los mismos experimentos de expresión transitoria en una estirpe de *A. nidulans* carente de esta ruta funcional. Para ello se obtuvo, mediante cruzamiento de dos estirpes apropiadas (ver sección 8.6 de materiales y métodos), una estirpe *palA1 argB2; ΔpacC* obteniéndose, posteriormente, de igual forma a la descrita anteriormente, transformantes de esta estirpe con copias únicas de los plásmidos p[*alcA^P::pacC(5-678)*] o p[*alcA^P::pacC(5-265)*] integradas en el *locus argB* (Fig. 19C). La figura 21C muestra como en este fondo genético se previno el procesamiento del producto primario de traducción de *pacC*, mientras que, como control, la estabilidad de la proteína PacC(5-265) no varió (Fig. 21D). Los resultados de estos experimentos de expresión transitoria establecen, por tanto, que la forma procesada de PacC proviene del procesamiento proteolítico del producto primario de traducción y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para que este procesamiento tenga lugar.

El análisis fenotípico de los distintos transformantes en medio sólido (Fig. 22) muestra cómo en un medio de cultivo ácido, tanto en condiciones de inducción como de represión para *alcA^P*, los transformantes crecen normalmente y, a diferencia de la estirpe *ΔpacC*, conidian normalmente, lo que indica que los niveles de PacC necesarios para la conidiación normal deben ser muy bajos, ya que en estas condiciones de cultivo PacC es indetectable por EMSA (Fig. 20). En condiciones de inducción, a pH alcalino, los transformantes con el transgén *alcA^P::pacC(5-265)* en los fondos genéticos *palA⁺* y *palA1* son indistinguibles. En ambos casos la expresión de PacC(5-265) suprime la sensibilidad a pH alcalino resultante de la mutación *ΔpacC*, lo que indica que el alelo *pacC(5-265)* es epistático (en condiciones de inducción) sobre la mutación *palA1*. Por el contrario, aunque la expresión de PacC(5-678) en un fondo genético

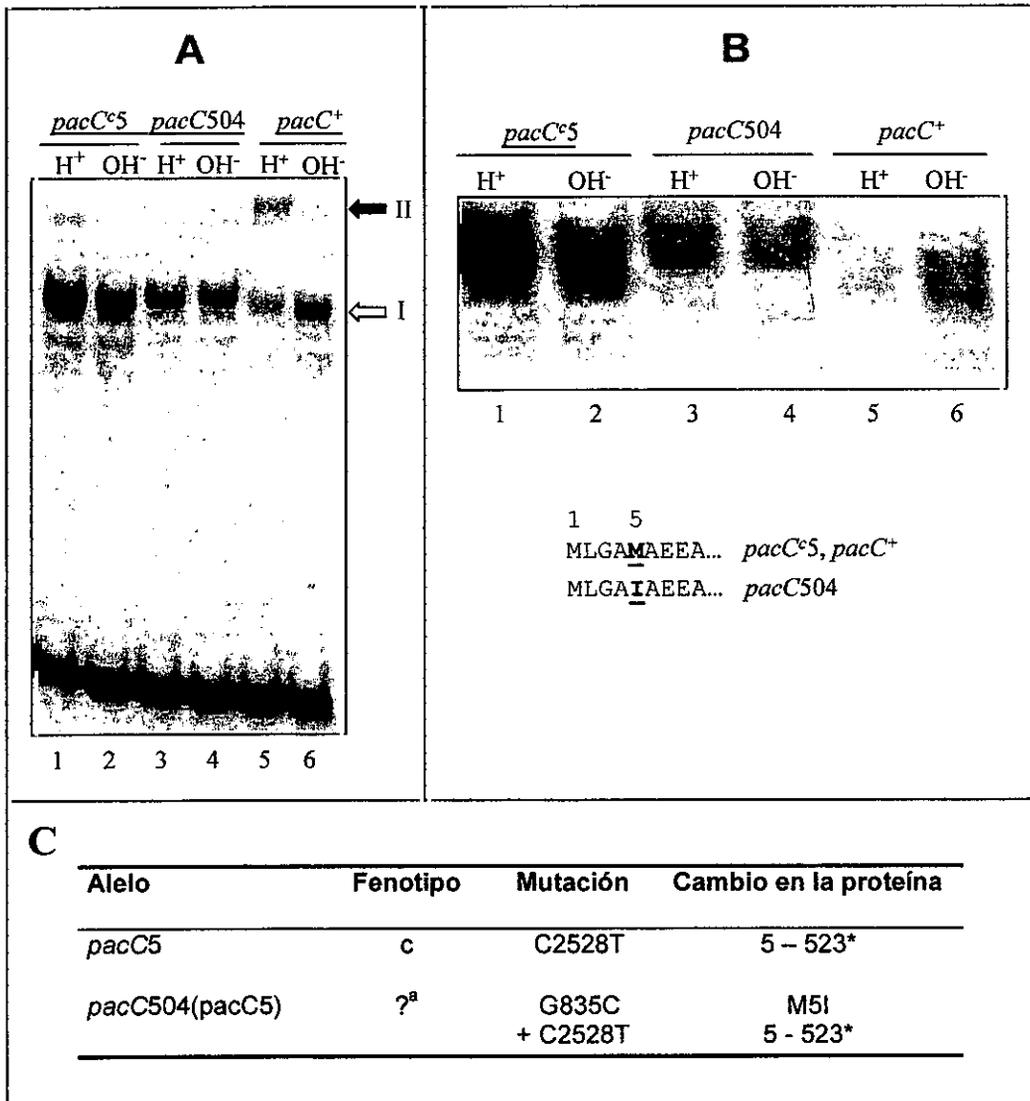


Figura 23. El procesamiento de PacC no afecta al extremo amino terminal de la proteína. (A) Análisis por EMSA de PacC en extractos de una estirpe silvestre (*pacC⁺*), una estirpe *pacC^{c5}* y una estirpe *pacC504* (*pacC^{c5}*). Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción (II), respectivamente. (B) EMSA en condiciones de alta resolución para la zona del complejo formado por la forma procesada de PacC. Nótese la formación de dos complejos predominantes con los extractos de las tres estirpes, cuya diferencia de movilidad se corresponde (considerando la diferencia de movilidad entre los complejos formados por la forma procesada de PacC en una estirpe *pacC⁺* o una estirpe *pacC^{c5}* y una estirpe *pacC504(pacC^{c5})* con una diferencia de ~ cuatro residuos en las proteínas que los forman. La mutación *pacC504(pacC^{c5})* no sólo resulta en la disminución de la movilidad del complejo proteína-DNA formado por la forma procesada de PacC sino también en la de los complejos de menor movilidad formados por los productos de degradación o procesamiento. Las estirpes se cultivaron 24 horas a 37° en MFA tamponado a pH ácido (H⁺) o alcalino (OH⁻) y con sacarosa al 3%(p/v) como principal fuente de carbono. (C) Cambios en la secuencia de *pacC* y en la correspondiente proteína resultantes de las mutaciones *pacC^{c5}* y *pacC504(pacC^{c5})*. ?ª La presencia de la mutación *pacC^{c5}* impide determinar el fenotipo de *pacC504*.

1.3 Determinación del límite de procesamiento de PacC.

Según Orejas *et al.* (1995), el extremo carboxilo terminal de la forma procesada de PacC debe estar alrededor del aminoácido 270. Con objeto de determinar este límite con más precisión, se han analizado los tamaños de versiones de PacC codificadas por una serie de alelos con mutaciones que resultan en truncamientos de la proteína en zonas próximas al supuesto límite de procesamiento, en comparación con el tamaño de la forma procesada de PacC. El análisis se ha hecho tanto por *western* como por EMSA (este último en condiciones de alta resolución (ver sección 9.16 de materiales y métodos)). En el análisis por *western* (Fig. 24D) pudo apreciarse cómo la forma procesada de PacC, que apareció como una doble banda (resultado que está de acuerdo con el análisis mediante EMSA de la figura 23B) presentaba una movilidad ligeramente mayor que las proteínas codificadas por alelos *pacC^{c/}50* y *pacC^{c/}20601* y una movilidad ligeramente menor que la proteína codificada por el alelo *pacC^{+/-}515*, lo que indica que el límite de procesamiento se encuentra entre los aminoácidos 250 y 260 (las M_r de las proteínas codificadas por los distintos alelos se muestran en la figura 24A). La proteína codificada por el alelo *pacC^{c/}20000* mostró una movilidad inesperadamente reducida, mientras que la proteína codificada por el alelo *pacC^{+/-}515* dio lugar a una banda adicional no detectada en el extracto de la estirpe *pacC^{+/-}508*. Estas alteraciones de movilidad podrían reflejar una composición de aminoácidos particular de las regiones carboxilo terminal de las proteínas codificadas por los alelos *pacC^{c/}20000* y *pacC^{+/-}515* que afectara a la unión de SDS a la cadena polipeptídica, modificando así la relación carga/masa y alterando, consecuentemente, la movilidad electroforética. Hames (1990) describe cómo las proteínas ácidas, básicas o las que son ricas en residuos de prolina muestran una movilidad electroforética anormal en SDS-PAGE, e incluso se han descrito cambios de movilidad de una proteína en SDS-PAGE debidos a la sustitución de un solo aminoácido (Seeburg *et al.*, 1984). Tanto la mutación *pacC^{c/}20000* como la mutación *pacC^{+/-}515* son mutaciones de cambio de fase de lectura que dan lugar a versiones truncadas de PacC con una cadena de residuos correspondiente a otra fase de lectura en el extremo carboxilo terminal. La proteína codificada por *pacC^{c/}20000* carece de las dos agrupaciones de residuos básicos comprendidas entre los aminoácidos 252 y 269 e incorpora un nuevo residuo de ácido glutámico en su extremo carboxilo terminal. En los últimos 65 residuos de esta proteína abundan los residuos de prolina y no hay residuos básicos. La proteína codificada por *pacC^{+/-}515* presenta 22 residuos de otro marco de lectura en su extremo carboxilo terminal entre los que se incluyen 6 residuos hidrofóbicos, 6 residuos básicos y 3 residuos de prolina. Probablemente alguna de estas modificaciones pueda alterar la unión de SDS a estas dos proteínas y, consecuentemente, provocar las anomalías en su movilidad en SDS-PAGE descritas anteriormente. El análisis por EMSA (Fig. 24C) proporcionó una resolución mucho mayor que la obtenida por la técnica de *western*. Adicionalmente, la proteína

grupos fosfato del DNA, lo que permite que las variaciones en el peso molecular de las proteínas se reflejen con extremada fidelidad en cambios de movilidad electroforética del correspondiente complejo DNA-proteína. En la figura 24 C puede apreciarse cómo en el extracto proteico de una estirpe *pacC*[°]50 se detectó un complejo mayoritario de movilidad electroforética ligeramente menor que la del complejo formado por la forma procesada de PacC y un complejo minoritario de igual movilidad electroforética, resultante de un procesamiento poco eficaz de la proteína codificada por este alelo. Este resultado indica que el extremo carboxilo terminal de la forma procesada de PacC debe localizarse en posición más amino terminal que el residuo 266. El mismo resultado se obtuvo al analizar extractos de una estirpe *pacC*[°]-20601 lo que indica que el sitio de procesamiento debe estar en posición amino terminal al residuo 260. El complejo detectado con el extracto de una estirpe *pacC*^{+/}515 presentó una movilidad ligeramente mayor que la del complejo correspondiente a la forma procesada de PacC (que apareció como un complejo doble probablemente debido a una heterogeneidad en su extremo carboxilo terminal (*vide supra*)) y el único complejo que se detectó con el extracto de una estirpe *pacC*[°]-20000 presentó una movilidad ligeramente menor que la del complejo formado por la forma procesada de PacC. La representación semilogarítmica de las *M_r* estimadas para las distintas versiones de PacC analizadas en función de las movilidades electroforéticas de los respectivos complejos DNA-proteína permitió estimar, mediante interpolación, que el extremo carboxilo terminal de la forma procesada de PacC responsable de la formación del complejo de mayor movilidad electroforética detectado en extractos de la estirpe *pacC*⁺, debe encontrarse en el agrupamiento de aminoácidos Lys252-Lys253-Arg254 o en su inmediata vecindad.

1.4 Mutaciones en *pacC* que afectan al procesamiento.

1.4.1 Mutaciones “missense” que mimetizan alcalinidad favorecen la accesibilidad de PacC a la proteasa procesativa.

El análisis por secuenciación de 3 mutaciones en *pacC* (*pacC*[°]39, -63 y -69) que mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino, por el grupo del profesor Arst (comunicación personal) mostró que estas mutaciones son mutaciones “missense” (Fig. 25C) que dan lugar a los cambios L266F, L259R y L340S, respectivamente. La mutación *pacC*[°]39 es una mutación termosensible y, a juzgar por la supresión parcial que produce de una mutación *palB7*, no es tan extrema como otras mutaciones *pacC*[°] (el resto de las mutaciones *pacC*[°] suprime completamente esta mutación (Caddick *et al.*, 1986a, Arst *et al.*, 1994)). El análisis mediante EMSA de PacC en extractos proteicos crudos (Fig. 25A) mostró cómo, de acuerdo

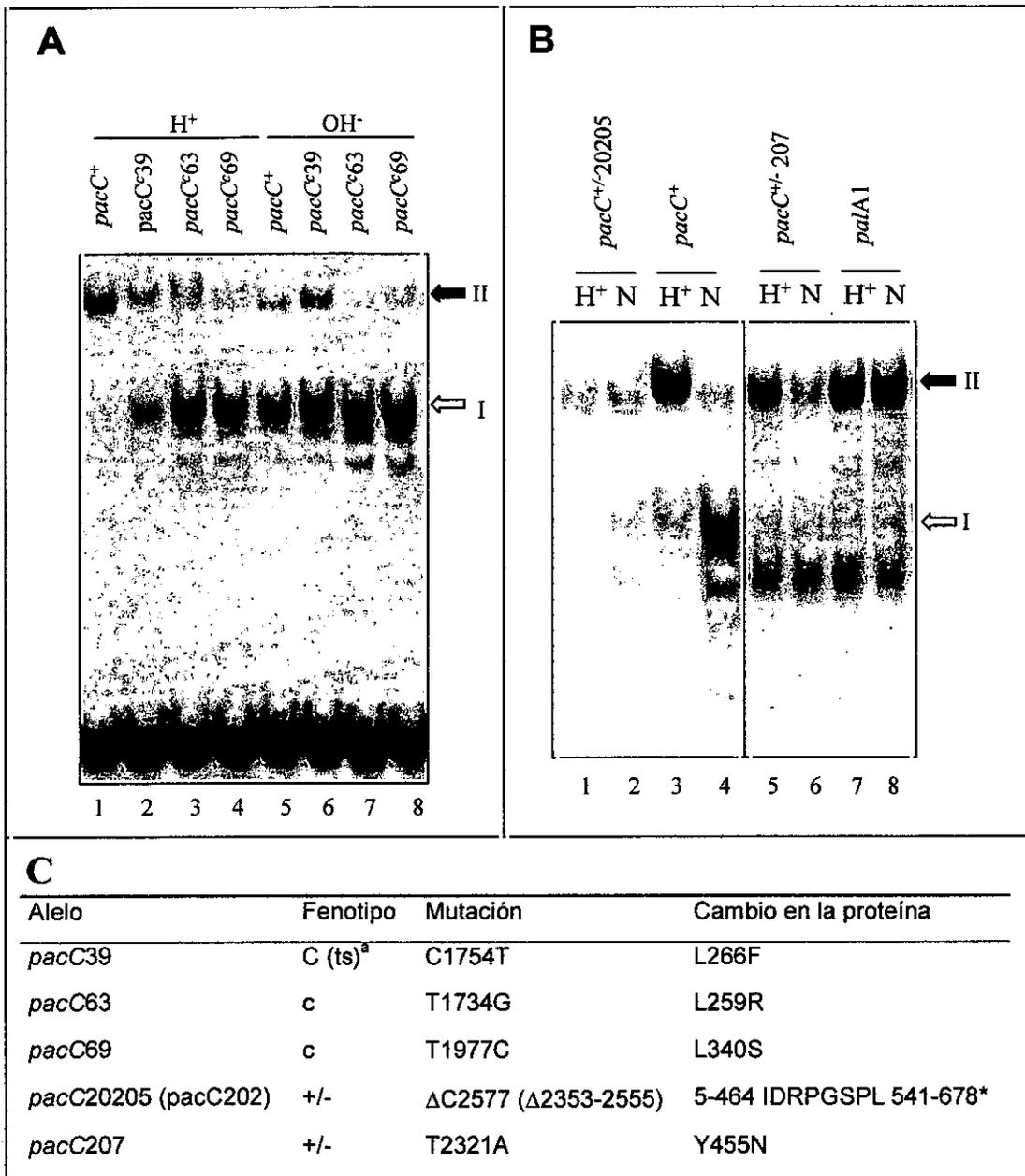


Figura 25. Mutaciones de PacC que afectan al procesamiento proteolítico de la proteína. Los análisis de PacC por EMSA fueron realizados con los extractos correspondientes a las indicadas. (A) Fenotipo de PacC resultante de mutaciones que dan lugar a sustituciones de un único aminoácido y mimetizan los efectos de un pH ambiental alcalino. (B) Fenotipo de PacC en mutaciones que mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido. (C) Cambios en la secuencia de *pacC* y en la correspondiente proteína resultantes de las mutaciones *pacC*^{C39}, *pacC*^{C63}, *pacC*^{C69}, *pacC*^{+/-20205}(*pacC*^{C202}), y *pacC*^{+/-207}. Todas las estirpes fueron cultivadas 24 horas a 37°C en MFA tamponado a pH ácido (H⁺), neutro (N) o alcalino (OH⁻) suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción (II), respectivamente.

con el fenotipo mencionado anteriormente, el procesamiento de PacC en una estirpe con una mutación *pacC*^{c39} es sólo parcialmente independiente del pH, de forma que si bien en condiciones de cultivo ácidas los niveles de procesamiento de PacC en esta estirpe son mayores a los de una estirpe *pacC*⁺, el procesamiento es claramente superior a pH alcalino. En estirpes con la mutación *pacC*^{c63} o *pacC*^{c69}, por el contrario, PacC se procesa constitutivamente (i.e. independientemente de pH), de forma semejante a como se procesa en estirpes con mutaciones *pacC*^c que codifican versiones de la proteína truncadas en la región carboxilo terminal. La sustitución resultante de la mutación *pacC*^{c69} (L340S) tiene lugar en una zona de la proteína considerablemente distante del sitio de procesamiento y del sitio donde se producen las sustituciones L266F y L259R resultantes de las mutaciones *pacC*^{c39} y *pacC*^{c63}, respectivamente. Por ello estas mutaciones, más que favorecer el reconocimiento del sitio de corte, parecen favorecer la accesibilidad de PacC a la proteasa procesativa.

1.4.2 Mutaciones que resultan en proteínas insensibles a la señal de pH ambiental.

pacC^{+/-20205} y *pacC*^{+/-207} son dos mutaciones de pérdida de función que, al igual que las mutaciones de pérdida de función en los genes *palA*, -B, -C, -F y -H (Arst *et al.*, 1994; Caddick *et al.*, 1986a; Denison *et al.*, 1995; Negrete-Urtasun *et al.*, 1997) de la ruta de transducción de la señal de pH ambiental, mimetizan los efectos del crecimiento en un medio de cultivo ácido. La mutación *pacC*^{+/-20205} resulta básicamente en una versión de PacC con la región comprendida entre los aminoácidos 465 y 540 delecionada, mientras que la mutación *pacC*^{+/-207} es una mutación "missense" que da lugar al cambio Y455N (Fig. 25 C). Estirpes de *A. nidulans* con estas mutaciones, a diferencia de estirpes con otras mutaciones *pacC*^{+/-} como *pacC*^{+/-206} o *pacC*^{+/-230}, que resultan en niveles muy bajos de PacC debido a la inestabilidad de sus productos génicos, crecen y esporulan normalmente tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras. El análisis por EMSA de extractos proteicos (Fig. 25 B) mostró cómo en una estirpe *pacC*^{+/-20205} los niveles de PacC eran muy bajos con respecto a una estirpe *pacC*⁺ y, al igual que en una estirpe *palA1*, la proteína prácticamente no se procesó en condiciones de cultivo neutras (condiciones en las que prácticamente toda la proteína se ha procesado en una estirpe *pacC*⁺). Este mismo patrón se observó también en una estirpe *pacC*^{+/-207}, con la diferencia de que en este caso se detectaron en condiciones de cultivo ácidas niveles de PacC semejantes a los detectados tanto en una estirpe *pacC*⁺ como en una estirpe *palA1*. Estos datos indican que tanto el residuo Y455 (sustituido por N en la proteína codificada por *pacC*^{+/-207}) como uno o más residuos de la región comprendida entre los aminoácidos 465 y 540 (deleción resultante de la mutación *pacC*^{+/-20205}) deben estar implicados en la recepción de la señal de pH ambiental o en las consecuencias a nivel conformacional resultantes de la

recepción de esta señal. Así, tanto la sustitución Y455N como la eliminación de alguno de los otros residuos mencionados, junto con la presencia de la región carboxilo terminal intacta (los 138 residuos carboxilo terminales en la proteína codificada por *pacC*^{+/20205}) hacen que PacC no pueda ser accesible a la proteasa procesativa. Estos resultados favorecen la hipótesis de que el paso regulado por el pH ambiental no es la actividad de la proteasa procesativa, sino el cambio conformacional de PacC entre una conformación no accesible y una conformación accesible a esta proteasa.

RESULTADOS

PARTE II

LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE PacC EN RESPUESTA A UN pH AMBIENTAL ALCALINO

2. Localización nuclear de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino.

2.1 localización subcelular de PacC.

Según el modelo de Orejas *et al.* (1995) la forma activa de PacC, capaz de activar la transcripción de los genes “alcalinos” y de prevenir la transcripción de los genes “ácidos”, es la forma procesada de la proteína. Esta forma se obtiene en respuesta a un pH ambiental alcalino mediante la eliminación proteolítica de unos 420 residuos a partir del extremo carboxilo terminal del producto primario de traducción, como consecuencia de la transducción de la señal de pH ambiental alcalino mediada por los productos codificados por los genes *pal* (ver parte 1 de resultados).

La actividad de muchos factores de transcripción está modulada negativamente por dominios en “cis” que, en ausencia de las señales ambientales que los activan, pueden prevenir su unión al DNA, su actividad “trans-activadora” o (en el caso de células eucariotas) su localización nuclear (revisado por Calkhoven y Geert, 1996). En este último caso, estos dominios pueden enmascarar la señal de localización nuclear (como en el caso de NF- κ B, Henkel *et al.*, 1992), interaccionar con otras proteínas que enmascaran esta señal (este es el caso del receptor de glucocorticoides en humanos (Picard *et al.*, 1988) o el factor Xnf7 de *xenopus* (Li *et al.*, 1994)) o ser responsables del anclaje del factor de transcripción a alguna de las membranas celulares (este es el caso de SREBP (revisado por Brown y Goldstein, 1997)) (ver una descripción más detallada de estos ejemplos en la sección 4.1 de introducción). Con objeto de estudiar si el pH ambiental regula no sólo el procesamiento de PacC sino también, como consecuencia de este procesamiento, su localización subcelular, se ha estudiado la distribución nucleo-citoplásmica de PacC tanto en una estirpe *pacC*⁺, como en estirpes con mutaciones *pacC*^o (que mimetizan los efectos de un pH ambiental alcalino) que resultan en versiones truncadas de la proteína (Tilburn *et al.*, 1995; Fig. 26, ver varios ejemplos más en la Fig. 7) y en estirpes con mutaciones de pérdida de función en genes *pal* (que mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido), en las que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino está bloqueada. Para ello, las diferentes estirpes se cultivaron durante 24 horas en MFA ácido y se obtuvieron las fracciones nuclear y citoplásmica mediante un protocolo de fraccionamiento subcelular (Van Heeswijck *et al.* (1991); ver sección 9.14 de materiales y métodos). La presencia y ausencia de núcleos en las fracciones nuclear y citoplásmica, respectivamente, así como la integridad de los núcleos, se verificó en todos los casos por microscopía de fluorescencia de muestras de ambas fracciones teñidas con DAPI (resultados no mostrados). La presencia de las distintas formas de PacC se analizó en extractos proteicos obtenidos de la fracción citoplásmica, de la fracción nuclear y de una

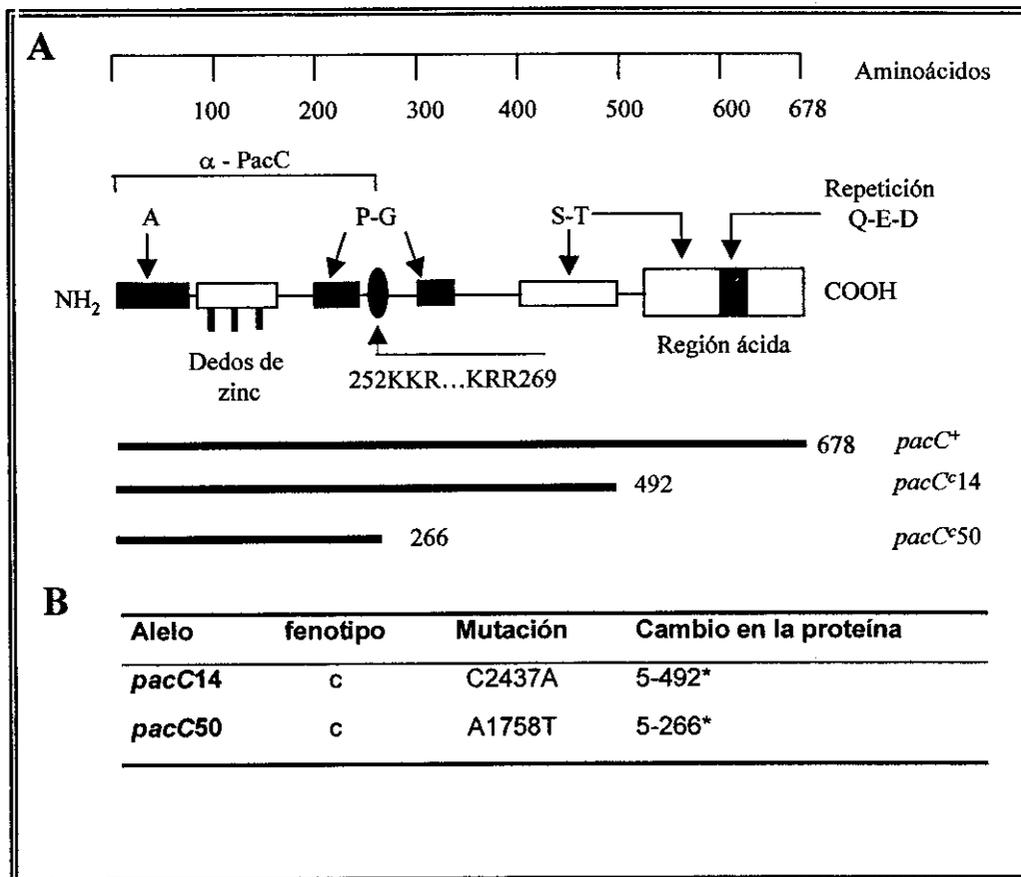


Figura 26. (A) Esquema de la proteína PacC que muestra algunas regiones de interés y los productos génicos de dos alelos constitutivos. Tanto la proteína silvestre como las versiones de PacC codificadas por los alelos indicados se representan mediante barras negras. Al final de estas barras se indica el residuo carboxilo terminal de las proteínas representadas. También se muestra la región de PacC presente en la proteína de fusión utilizada para obtener el antisuero contra el extremo amino terminal de PacC (α - PacC). (B) Cambios en la secuencia de *pacC* y en la correspondiente proteína resultantes de las mutaciones *pacC*¹⁴ y *pacC*⁵⁰.

muestra sin fraccionar (extracto total). Como control de la contaminación citoplásmica de la fracción nuclear se analizó, en todos los casos, la presencia de hexoquinasa (proteína de localización exclusivamente citoplásmica) por la técnica de *western*.

El análisis por la técnica de *western* de PacC (Fig. 27C) mostró cómo en un extracto total de una estirpe *pacC*⁺ y según lo esperado el producto primario de traducción es predominante en condiciones de cultivo ácidas, siendo apenas detectable la forma procesada de PacC. El mismo resultado se obtuvo al analizar la fracción citoplásmica, mientras que en la fracción nuclear, si bien seguían detectándose niveles apreciables del producto primario de traducción, se observó claramente un enriquecimiento en la forma procesada, sugiriendo la

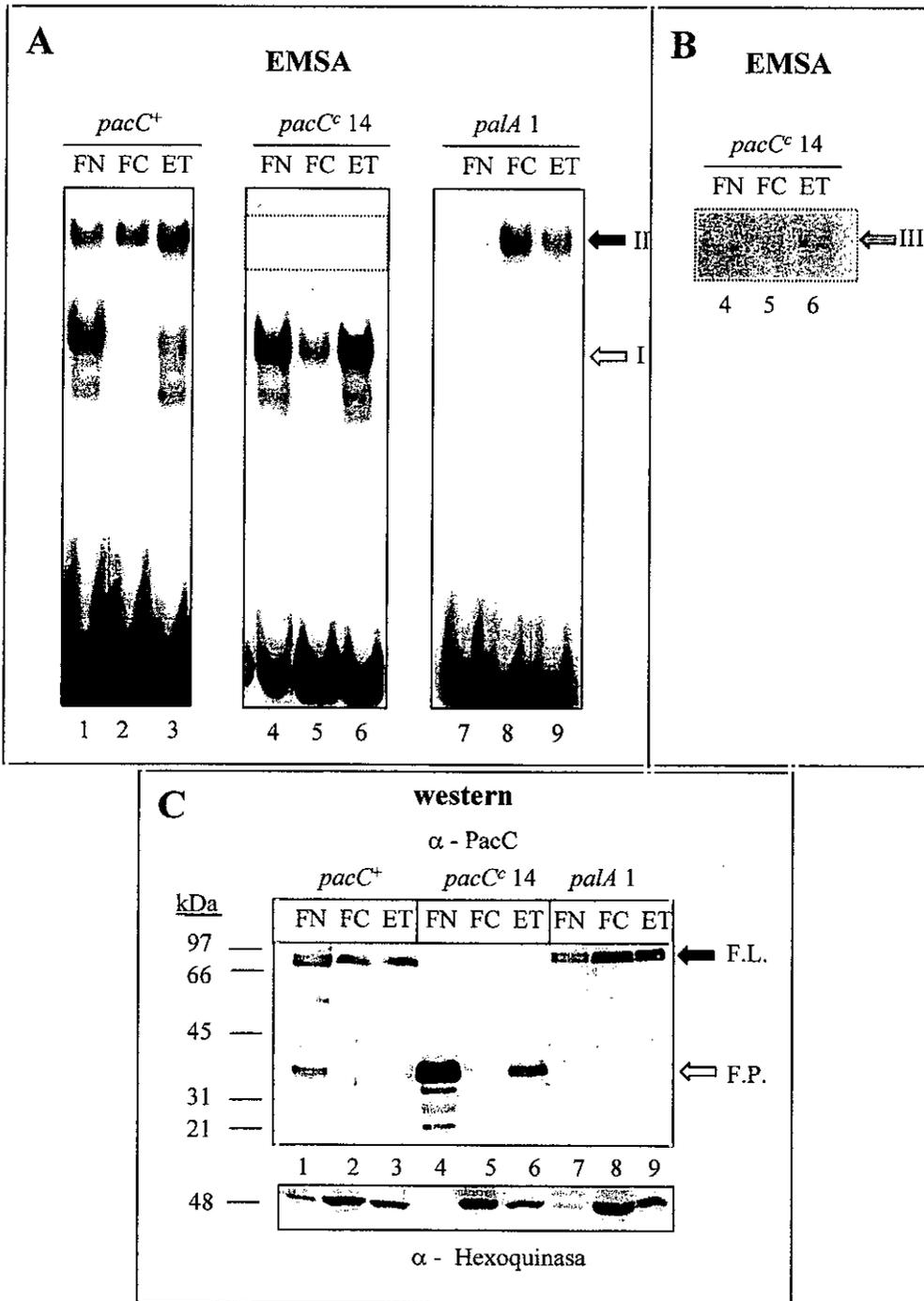


Figura 27. Distribución entre los compartimentos nuclear y citoplásmico de PacC en una estirpe silvestre y en estirpes con las mutaciones *pacC*^{c14} y *palA*1. (A) Análisis por EMSA de PacC en un extracto total (ET) y en extractos de la fracción nuclear (FN) y citoplásmica (FC) de las estirpes indicadas. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos proteína-DNA formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción (II), respectivamente. (B) sobreexposición de la parte superior del EMSA correspondiente a la estirpe *pacC*^{c14} mostrando el complejo (III) formado por el producto primario de traducción (flecha punteada). (C) Parte superior: análisis por *western* con un antisuero contra el extremo amino terminal de *pacC* (α - PacC) de los mismos extractos analizados por EMSA. Las flechas blanca y negra indican la forma procesada de PacC (F.P.) y el producto primario de traducción de *pacC* (F.L.), respectivamente. Parte inferior: análisis por *western* de estos mismos extractos con un antisuero contra la proteína hexoquinasa de *S. cerevisiae*. Todas las estirpes se cultivaron 24 horas a 37°C en MFA tamponado a pH ácido y suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono.

localización nuclear preferente de ésta. En una estirpe con una mutación *pacC*^{°14} (mutación de ganancia de función (Fig. 26) que resulta en una versión truncada de PacC que se procesa constitutivamente (i. e. independientemente del pH; Orejas *et al.*, 1995)) la única forma de PacC que se detectó por *western* es la forma procesada de la proteína, que se localizó casi exclusivamente en la fracción nuclear (Fig. 27C). Finalmente, en una estirpe con una mutación *pa/A1*, PacC no se procesó y, si bien algo de la proteína se detectó en la fracción nuclear, su localización fue preferencialmente citoplásmica (Fig. 27C).

Los resultados del análisis por EMSA (que tiene una mayor sensibilidad de detección de PacC) de estos mismos extractos (Fig. 27A) coincidieron con los resultados obtenidos por *western*. Así, en un extracto total de una estirpe *pacC*⁺, si bien el complejo correspondiente al producto primario de traducción (complejo II) era predominante, se detectaron niveles apreciables del complejo I, correspondiente a la forma procesada de PacC que no se formó con la fracción citoplásmica y se formó preferentemente con la fracción nuclear. En una estirpe *pacC*^{°14} se detectaron dos complejos, uno de ellos correspondiente a la forma procesada de PacC (complejo I), y el otro, de menor movilidad electroforética (complejo III) (solamente detectable en una sobreexposición del EMSA (Fig. 27B)), correspondiente al producto primario de traducción de *pacC*^{°14}. Ambas formas de la proteína se localizaron preferentemente en la fracción nuclear, de forma que la formación del complejo III fue prácticamente indetectable con la fracción citoplásmica y los niveles de forma procesada detectados con esta fracción fueron muy inferiores a los detectados con la fracción nuclear. En una estirpe *pa/A1* se detectó un complejo mayoritario correspondiente al producto primario de traducción de *pacC* (complejo II), que se localizó casi exclusivamente en el citoplasma.

Con objeto de descartar que la localización citoplásmica preferente de PacC en una estirpe *pa/A1* fuera debida a un efecto específico de esta mutación y no al bloqueo de la ruta de transducción de señal, se analizó la localización nuclear y citoplásmica de PacC en una estirpe con una mutación de pérdida de función en otro de los genes *pal*. El análisis de PacC por EMSA (Fig. 28A) mostró cómo en una estirpe *palH17*, al igual que en una estirpe *pa/A1* (ambas mutaciones son fenotípicamente indistinguibles (Arst *et al.*, 1994)), PacC prácticamente no se procesó y se localizó preferentemente en la fracción citoplásmica, de forma que si bien con el extracto total de esta estirpe se detectó la formación del complejo I, el complejo II era mayoritario y se formó preferentemente con el extracto citoplásmico. Este resultado sugiere que es el bloqueo de la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino y no las particularidades de cualquiera de estas dos mutaciones lo que determina la localización preferentemente citoplásmica de PacC en estas estirpes.

La figura 28A muestra cómo, al igual que en una estirpe *pacC*^{°14}, en una estirpe *pacC*^{°50} (que codifica para un producto truncado similar a la forma procesada de PacC (Fig. 26) y mimetiza los efectos de un medio de cultivo alcalino) PacC se localizó preferentemente

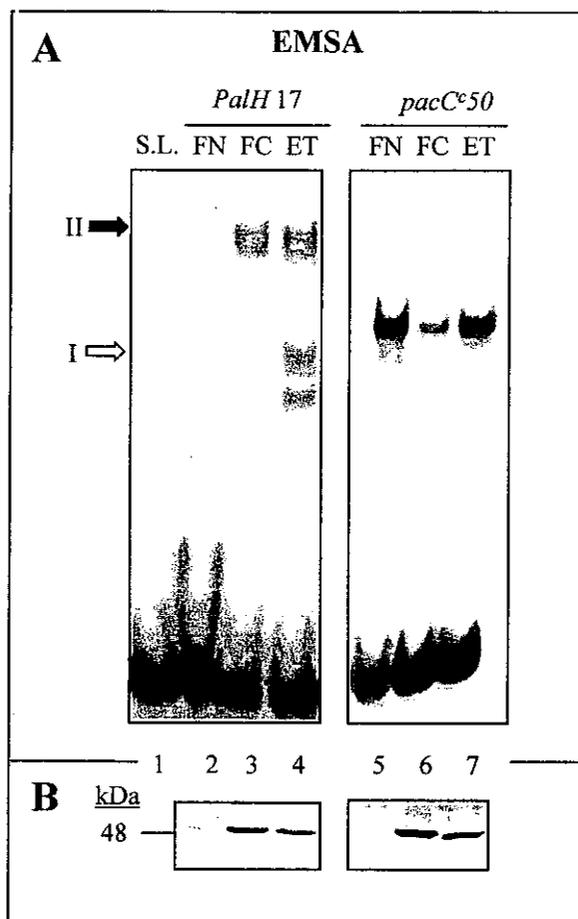


Figura 28. Distribución entre los compartimentos nuclear y citoplásmico de PacC en estirpes con las mutaciones *palH17* y *pacC⁵⁰*. (A) Análisis por EMSA de PacC en un extracto total (ET) y en extractos de la fracción nuclear (FN) y citoplásmica (FC) de las estirpes indicadas. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos proteína-DNA formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción (II), respectivamente. (B) Análisis por *western* de la proteína hexoquinasa en los mismos extractos analizados por EMSA en (A). Ambas estirpes se cultivaron 24 horas a 37° en MFA tamponado a pH ácido y suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono.

en el núcleo, de forma que los niveles del complejo mayoritario (detectado por EMSA) que se formó con los extractos proteicos de esta estirpe (de movilidad ligeramente menor a la del complejo I (Fig. 24)) fueron claramente mayores con la fracción nuclear que con la citoplásmica.

Estos resultados muestran que la señal de pH ambiental alcalino, al disparar el procesamiento de PacC, regula positivamente su localización nuclear, de forma que la forma procesada de PacC se localiza preferentemente en la fracción nuclear mientras que en ausencia de una ruta funcional de transducción de la señal (mutaciones *pal'*) el producto primario de traducción de PacC no se procesa y se localiza preferentemente en el citoplasma.

En una estirpe *pacC*¹⁴, mutación que resulta en una proteína PacC truncada en el aminoácido 492, el producto primario de traducción se localiza preferentemente en el núcleo, lo que sugiere que es la región carboxilo terminal de PacC lo que previene la localización nuclear de la proteína y que al facilitar su eliminación, la señal *pal* provoca la localización nuclear de este factor de transcripción. Al igual que la forma procesada de PacC, el producto primario de traducción de *pacC*⁵⁰, proteína de tamaño similar a la forma procesada, se localiza preferentemente en la fracción nuclear. El hecho de que (a diferencia de los que ocurre en una estirpe *pal*) en presencia de una ruta *pal* funcional parte del producto primario de traducción de *pacC* (estirpe *pacC*⁺) se localice en la fracción nuclear, sugiere que probablemente no sólo el procesamiento sino también el paso de una conformación "cerrada" a una conformación "abierta" puede regular positivamente la localización nuclear de PacC, lo que implicaría que el extremo carboxilo terminal de PacC sólo previene su localización nuclear cuando la proteína se encuentra en la conformación no accesible a la proteasa procesativa.

2.2 El pH ambiental regula *in vivo* la localización subcelular de PacC.

PacC se procesa en respuesta a un pH ambiental alcalino, de forma que en una estirpe silvestre de *A. nidulans* los niveles de la forma procesada de PacC aumentan al aumentar el pH del medio de cultivo (Orejas *et al.*, 1995; sección 1.4.1 de resultados). En la sección anterior se demuestra, mediante fraccionamientos subcelulares *in vitro*, que la forma procesada de PacC se localiza en el núcleo y solamente si la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es funcional, parte del producto primario de traducción se localiza también en este compartimento celular. Estos datos indican que el pH ambiental regula la localización subcelular de PacC.

Con objeto de comprobar *in vivo* estos resultados se ha estudiado cómo afecta el pH ambiental a la localización subcelular de PacC mediante fusiones a la proteína verde fluorescente (GFP) (revisado por Tsien, 1998), que nos han permitido estudiar la localización subcelular de distintas versiones de PacC mediante microscopía de fluorescencia. La versión utilizada de la GFP, sGFP-TYG, está codificada por un gen sintético cuyos codones han sido optimizados para su uso en células humanas y en el que, además, se ha introducido una mutación resultante en el cambio S65T dentro del cromóforo (Haas *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 1996). Esta versión de la proteína, que da lugar a una fluorescencia entre 40 y 120 veces superior a la de la proteína silvestre al ser ambas expresadas en células humanas (Hass *et al.*, 1996) y del orden de 100 veces superior al ser ambas expresadas en células de diferentes especies vegetales (Chiu *et al.*, 1996), ha sido ya utilizada en *A. nidulans* para estudiar la migración y ubicación de los núcleos en las hifas (Suelmann *et al.*, 1997; Suelmann *et al.*,

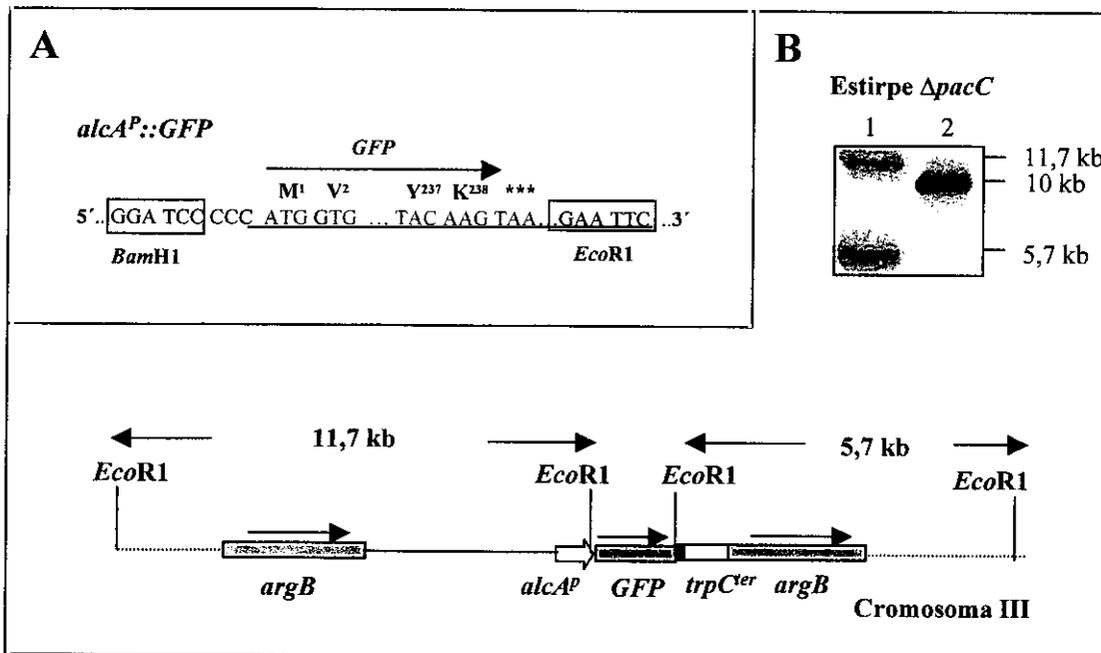


Figura 29. Caracterización por la técnica de Southern de un transformante de la estirpe $\Delta pacC$ con una única copia del transgén $alcA^P::GFP$ integrada en el locus $argB$. (A) Secuencia de una región del plásmido $p[alcA^P::GFP]$ que muestra los extremos 5' y 3' de la ORF del gen GFP así como los sitios de restricción utilizados en el clonaje de GFP en el plásmido $pALC$. (B) Hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con $EcoRI$) de este transformante (carril 1) utilizando una sonda para $argB$. Como control se empleó el DNA de la estirpe receptora (carril 2). En la parte inferior se muestra un esquema de la integración de una única copia del plásmido $p[alcA^P::GFP]$ en el gen $argB$ (cromosoma III), en el que se indican los tamaños de los fragmentos de restricción detectados en el experimento de Southern.

1998), las modificaciones nucleares durante la mitosis (Fernández-Avalos *et al.*, 1998) y la caracterización de la NLS de la proteína PrnA (Claudio Scazzocchio, comunicación personal)

Inicialmente se estudió la localización subcelular de GFP en *A. nidulans*. Con este fin, se construyó el plásmido $p[alcA^P::GFP]$ (Fig. 29A), que dirige la expresión de GFP bajo el control de $alcA^P$. Este plásmido fue introducido por transformación en una estirpe $\Delta pacC$ de *A. nidulans*, seleccionándose un transformante con una única copia de la construcción integrada por recombinación homóloga en el locus $argB$ (Fig. 29B). En este transformante, cultivado en condiciones de inducción para $alcA^P$, se detectó uniformemente por toda la hifa la fluorescencia debida a la GFP (Fig. 30), lo que indica que la proteína está presente tanto en los núcleos como en el citoplasma. Este resultado, debido probablemente a que el tamaño de la GFP (26,888 kDa) permite que ésta difunda libremente entre los núcleos y el citoplasma, está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores (Suelmann *et al.*, 1997;

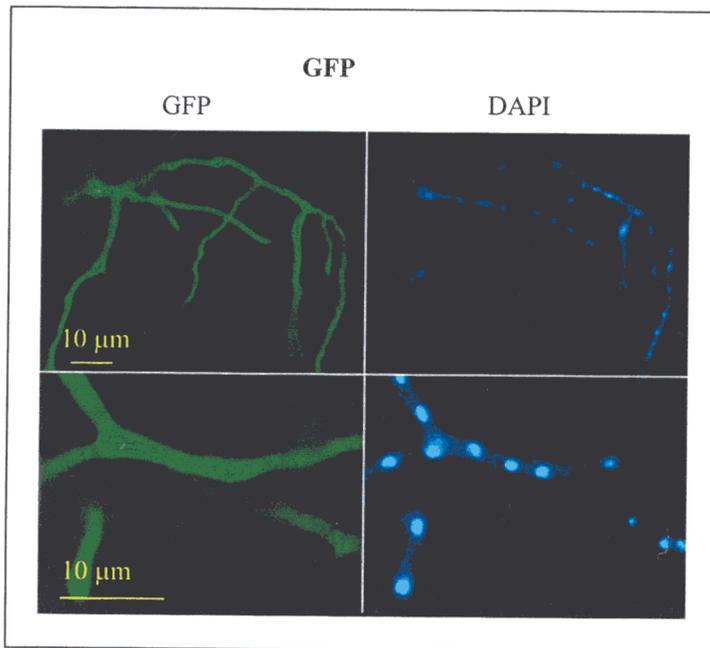


Figura 30. Localización subcelular de *GFP* en *A. nidulans*. Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de la estirpe recombinante *alcA^P::GFP; ΔpacC* recogidas tras 20 h de cultivo en MFA ácido en condiciones de inducción para *alcA^P*. El micelio se fijó con formaldehído (3.5%) y se tiñó con DAPI (0.031 μg/ml). Las imágenes (2 segundos de exposición) se tomaron utilizando filtros apropiados para la detección de la fluorescencia de la GFP o del DAPI. Parte superior, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos.

Suelmann *et al.*, 1998; Fernández-Avalos *et al.*, 1998; Claudio Scazzocchio, comunicación personal).

Posteriormente se construyó el plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-678)*] que dirige la expresión bajo *alcA^P* del producto primario de traducción de *pacC* con la GFP fusionada en su extremo amino terminal (Fig. 31A). Esta construcción se introdujo por transformación en una estirpe *ΔpacC* y en una estirpe *palA1; ΔpacC*, seleccionándose como en casos anteriores y en cada una de las estirpes receptoras un transformante con una sola copia de la construcción integrada en el locus *argB* (Fig. 31B).

El análisis fenotípico en medio sólido (Fig. 32) mostró cómo el transformante con la construcción *alcA^P::GFP* es indistinguible de la estirpe *ΔpacC* y, tanto en el fondo genético *ΔpacC* como en el fondo genético *palA1; ΔpacC*, los transformantes con el transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* son indistinguibles en cuanto a conidiación y crecimiento de los transformantes *alcA^P::pacC(5-678)*, lo que indica que la presencia de la GFP en el extremo amino terminal de PacC no previene su función.

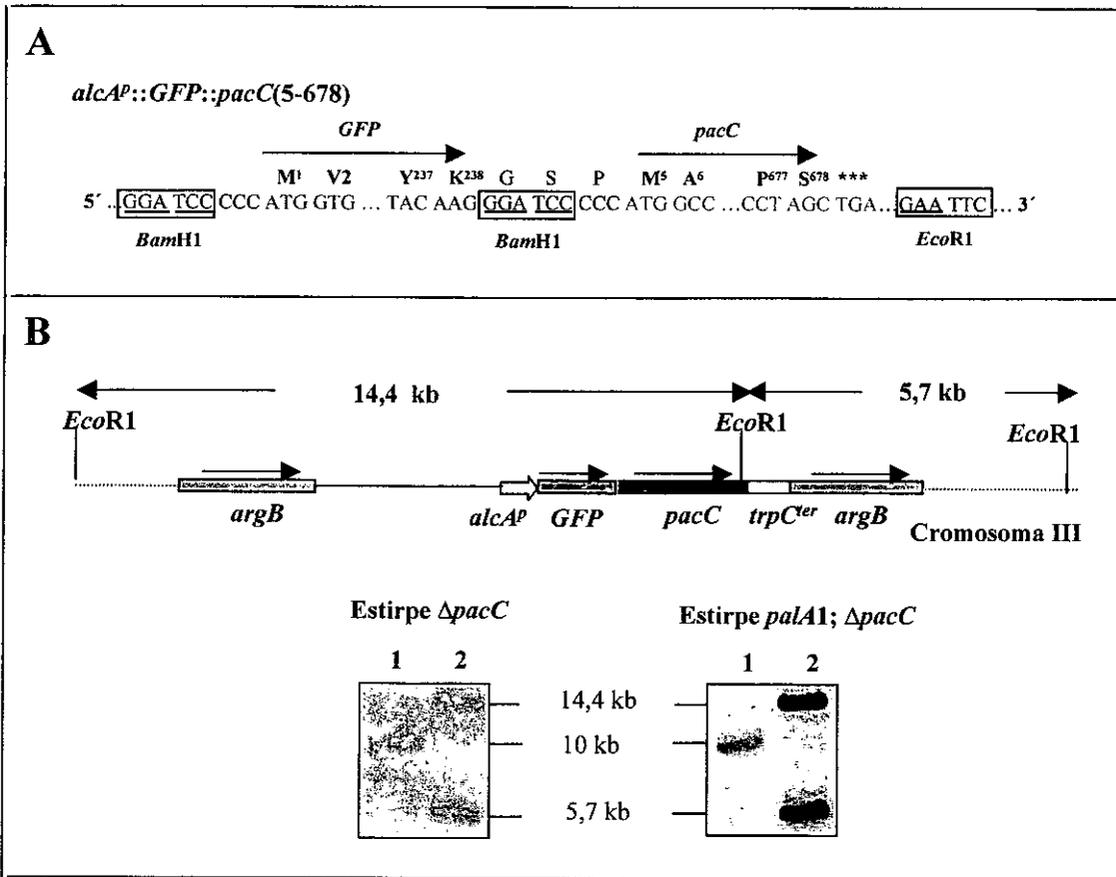


Figura 31. Caracterización de estirpes recombinantes en los fondos *palA⁺* y *palA1* con una copia única del transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* integrado en el locus *argB*. (A) secuencia de una región del plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-678)*] que muestra los extremos 5' y 3' de las ORFs de los genes *GFP* (en verde) y *pacC* (en azul), así como los sitios de restricción que se utilizaron para su clonaje en el plásmido pALC. (B) Esquema de la integración de una única copia del plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-678)*] en el gen *argB* (cromosoma III) de una estirpe de *A. nidulans*, en el que se indican los tamaños de los fragmentos de restricción detectados en el experimento de Southern. En la parte inferior se muestra la hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *Eco*RI) de los transformantes de las estirpes indicadas (carril 2) utilizando una sonda para *argB*. Como control se emplearon los DNAs de las estirpes receptoras (carril 1).

Los transformantes *palA⁺* y *palA1* con la construcción *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* se precultivaron durante 14 horas en condiciones de represión en un medio de cultivo tamponado a pH ácido, tras lo cual se recogió el micelio y se transfirió a un medio tamponado a pH ácido, neutro o alcalino (a este último pH se cultivó solamente el transformante *palA⁺*, ya que las mutaciones *pal* previenen el crecimiento a pH alcalino) cultivándose el micelio durante 8 horas más en condiciones de inducción. Como estirpes control se cultivaron, de igual forma, el transformante *alcA^P::GFP* y dos transformantes, uno de la estirpe $\Delta pacC$ y el otro de la estirpe

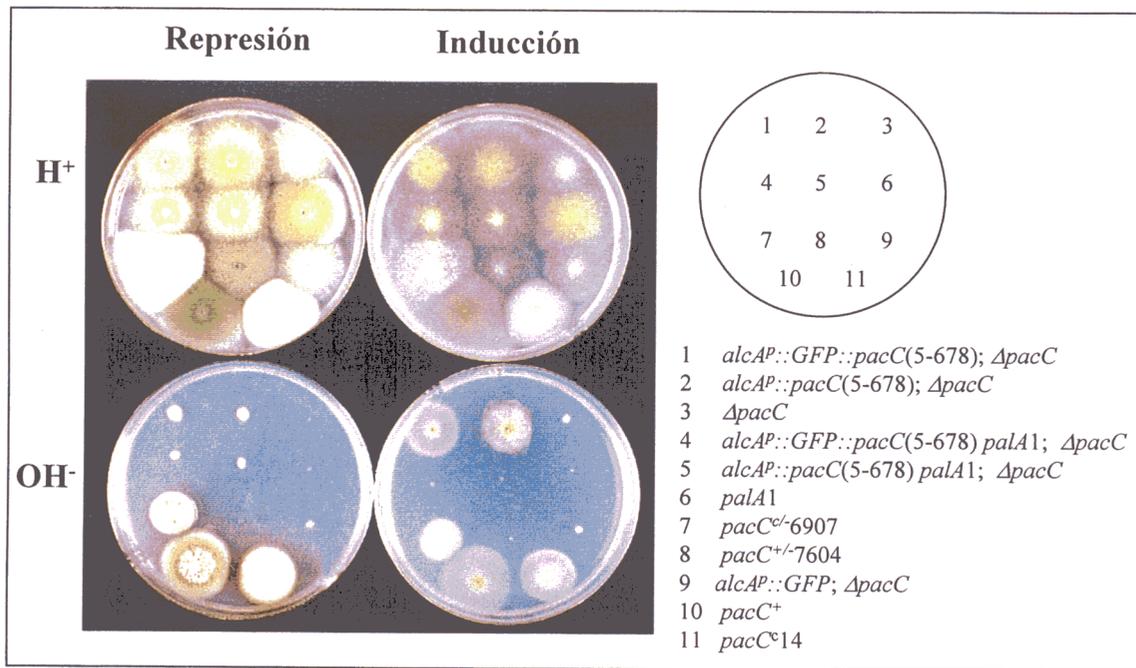


Figura 32. Fenotipo en placa de los transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ y $palA1$; $\Delta pacC$ con el transgén $alcA^P::GFP::pacC::(5-678)$. Los transformantes y las estirpes control indicadas se cultivaron como se indica, en las mismas condiciones a las descritas en la figura 22.

$palA1$; $\Delta pacC$, con el transgén $alcA^P::GFP::pacC(5-250)$ (en ambos fondos genéticos la proteína GFP::PacC(5-250) se localiza preferentemente en los núcleos (Ver sección 2.3.1 de resultados)). La estirpe $alcA^P::GFP$ se cultivó en condiciones de inducción en medios tamponados a pH ácido y neutro y las estirpes $alcA^P::GFP::pacC(5-250)$ en medios tamponados a pH ácido y alcalino. El análisis por microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de los transformantes recogidas tras el cultivo en condiciones de inducción mostró cómo, según lo esperado, la fluorescencia resultante de la expresión de GFP se detectó uniformemente por toda la hifa, tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras (Fig. 33A), y la fluorescencia resultante de la expresión de GFP::PacC(5-250) se localizó preferentemente en los núcleos en las dos condiciones de cultivo (*i. e.* independientemente del pH ambiental) y en los dos fondos genéticos (*i. e.* independientemente de la presencia o ausencia de una ruta *pal* funcional) (Fig. 33B). La fluorescencia resultante de la expresión de GFP::PacC(5-678) en un fondo genético $palA1$, tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras, y en un fondo genético $palA^+$, en condiciones de cultivo ácidas, si bien era algo más intensa en los núcleos, se detectó uniformemente por toda la hifa (Fig. 33A). Sin embargo, en un fondo $palA^+$, tanto en condiciones de cultivo neutras como alcalinas, la fluorescencia se detectó casi exclusivamente

A

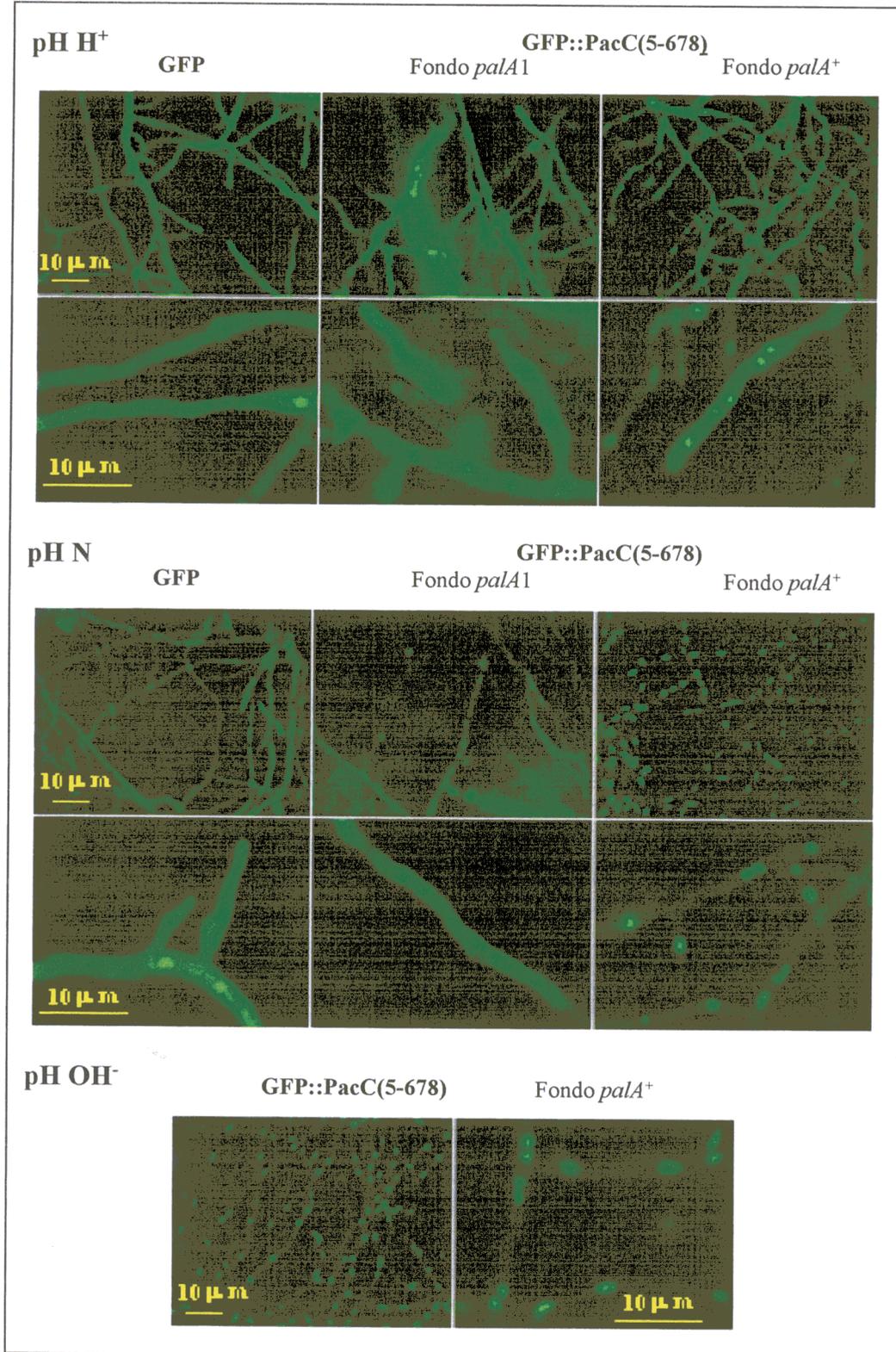
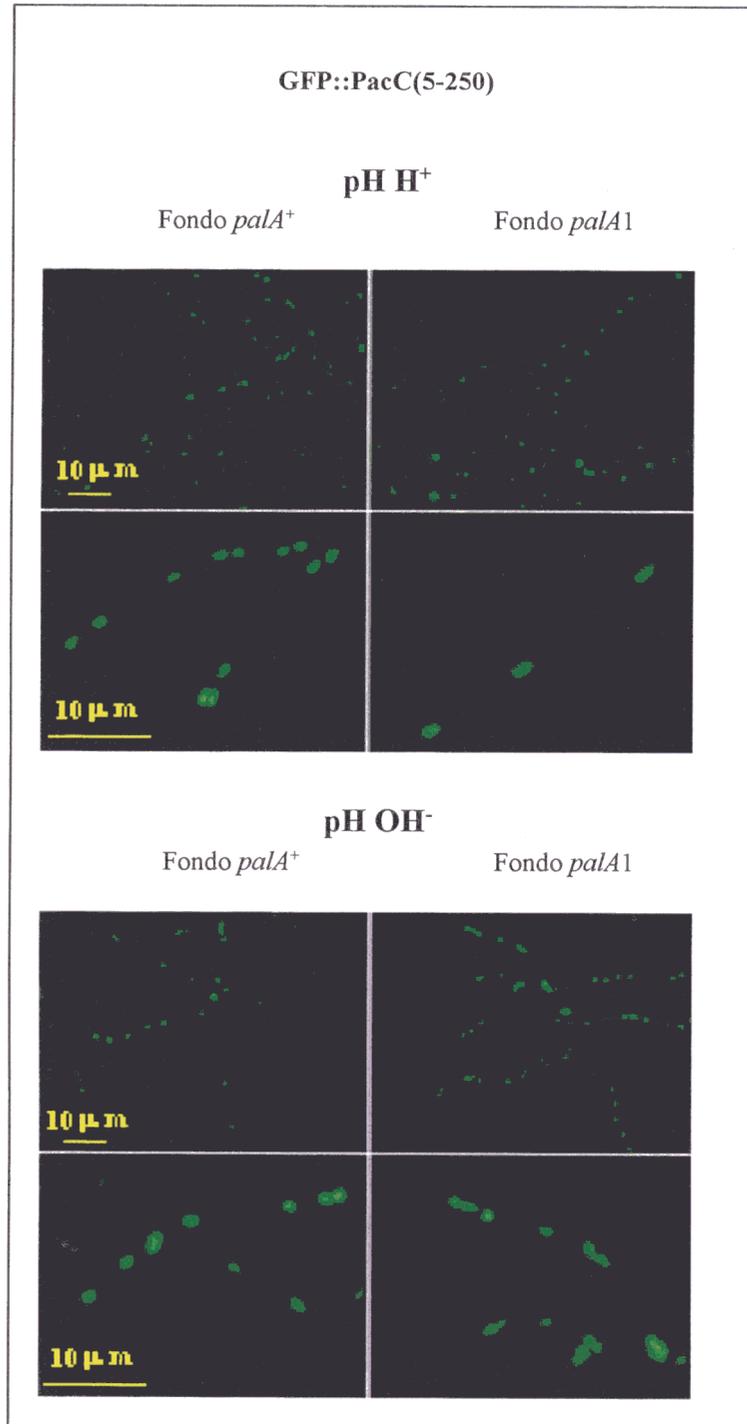


Figura 33. Localización subcelular *in vivo* de PacC en función del pH ambiental. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de los transformantes con el transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* en los fondos *palA1* y *palA*⁺. Las estirpes se cultivaron 14 horas en MFA ácido en condiciones de cultivo represoras y 8 horas adicionales en condiciones de inducción en MFA tamponado a pH ácido (H⁺, pH final 5.8), neutro (N, pH final 6.8) o alcalino (OH⁻, pH final 7.6), según se

B



indica. Como estirpes control se cultivaron en iguales condiciones estirpes recombinantes con el transgén *alcA^P::GFP* en un fondo *palA*⁺ o con el transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* en los fondos *palA*⁺ y *palA1* (B). La exposición en todos los casos fue de 5 segundos. Paneles de la parte superior de los paneles, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos.

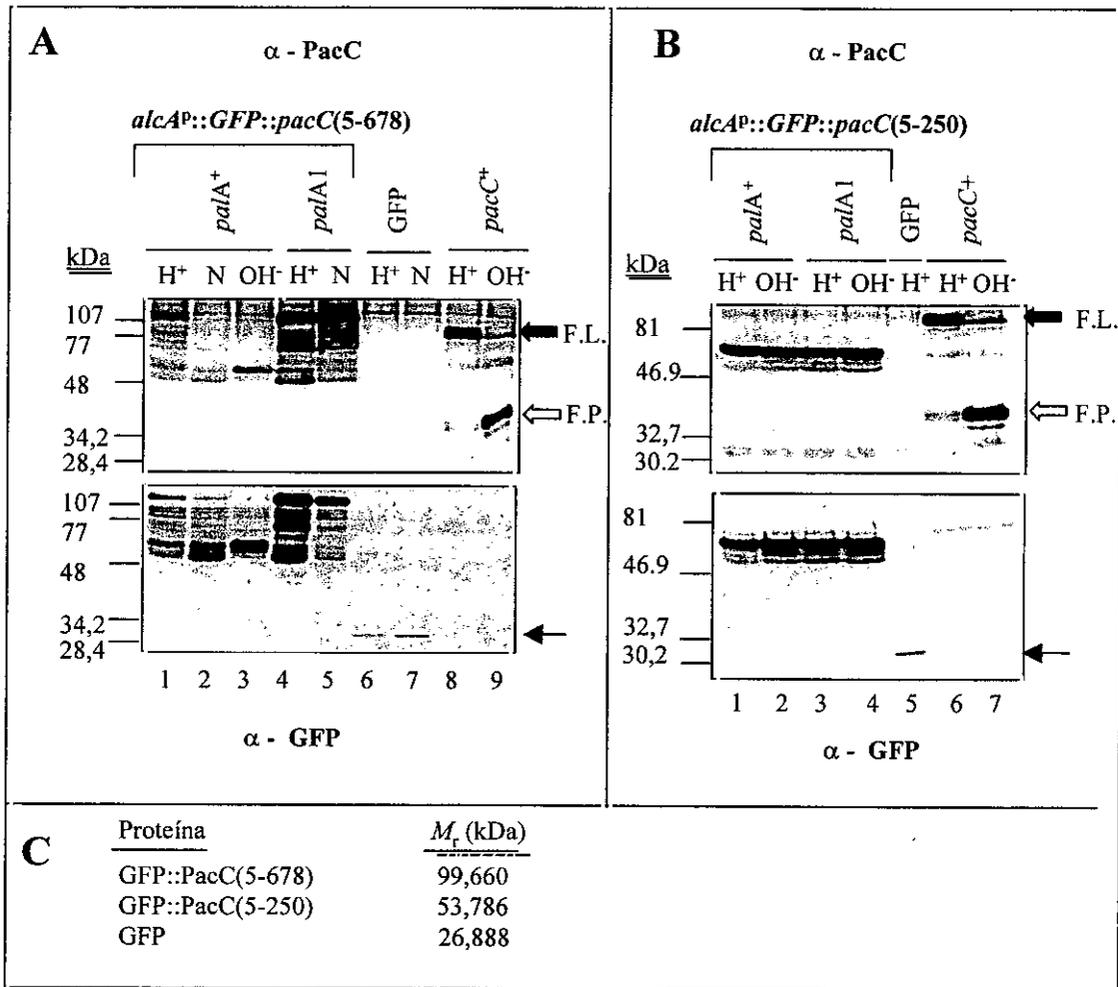


Figura 34. Análisis por western de proteínas recombinantes GFP::PacC. Se analizaron extractos proteicos de estirpes recombinantes con los transgenes *alcA^P::GFP::PacC(5-678)* (A) o *alcA^P::GFP::PacC(5-250)* (B) en los fondos *palA⁺* y *palA1* y, como control, con el transgén *alcA^P::GFP* en el fondo *palA⁺* (paneles A y B). Los extractos fueron obtenidos de micelio procedente de los cultivos en condiciones de inducción descritas en la figura 33. Se utilizaron antisueros contra el extremo amino terminal de PacC (α - PacC, parte superior de los paneles A y B) y contra GFP (α - GFP, parte inferior de los paneles). Se utilizaron dos membranas independientes idénticas. Como control, se muestran las proteínas detectadas con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC⁺*, paneles A y B) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido o alcalino suplementado con sacarosa al 3% como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra (parte superior de los paneles) indican la forma procesada de PacC (F.L.) y el producto primario de traducción (F.P.), respectivamente. La flecha negra (parte inferior de los paneles) indica la proteína GFP. H⁺, pH ácido; OH⁻, pH alcalino; N, pH neutro. (C) M_r de las proteínas indicadas.

en los núcleos (Fig. 33A). Estos resultados muestran que el pH ambiental regula la localización subcelular de PacC, de forma que en respuesta a un aumento del pH del medio de cultivo, PacC se localiza en el núcleo, y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino codificada por los genes *pal* es necesaria para esta regulación.

El análisis por *western* de PacC (con un antisuero contra su región amino terminal) en extractos proteicos de células cultivadas en condiciones de inducción (Fig. 34A panel superior), mostró cómo tras inducir la expresión de GFP::PacC(5-678) en un fondo *palA*⁺ y en condiciones de cultivo ácidas la mayor parte de PacC se detectó como producto primario de traducción y solamente una parte minoritaria se encontró formando parte de otras proteínas de menor tamaño. En condiciones de cultivo alcalinas, por el contrario, la mayor parte de PacC se detectó como una proteína de menor peso molecular, y se detectaron bajos niveles del producto primario de traducción. La *M_r* estimada de esta proteína de menor tamaño (que se correspondía con el de una proteína que estuviera formada por GFP y la forma procesada de PacC) así como el hecho de que sus niveles aumentaran al aumentar el pH del medio de cultivo, aparentemente a expensas del producto primario de traducción, sugieren que esta proteína de menor *M_r* proviene del procesamiento de GFP::PacC(5-678). La mutación *palA1* básicamente previno el procesamiento de GFP::PacC(5-678), tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras (dando lugar a niveles elevados del producto primario de traducción), aunque aparecieron otras proteínas de menor peso molecular probablemente debidas a la proteólisis del producto primario de traducción (*vide infra*). En células transformadas con *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* (Fig. 34B panel superior), tanto en condiciones de cultivo ácidas como alcalinas e independientemente de la presencia o ausencia de la mutación *palA1*, se detectó casi exclusivamente el producto primario de traducción, siendo sus niveles muy parecidos en los dos fondos genéticos (*palA*⁺ o *palA1*) y en las dos condiciones de cultivo. Los resultados del análisis por *western* utilizando un antisuero contra GFP en estos mismos extractos coincidieron tanto en el caso de los transformantes con la construcción *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* (Fig. 34A parte inferior) como en el caso de los transformantes con la construcción *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* (Fig. 34B parte inferior) con los resultados obtenidos con el antisuero contra el extremo amino terminal de PacC y mostraron además cómo en ninguno de los extractos existían niveles apreciables de GFP libre. Estos resultados indican que la fluorescencia observada no fue debida en ningún caso a la presencia de GFP libre (resultante, por ejemplo, de una proteólisis de los distintos productos primarios de traducción) y que reflejó, en todos los casos, la localización subcelular de las distintas proteínas GFP::PacC.

El análisis por EMSA de PacC (Fig. 35) mostró cómo en los extractos de células *palA*⁺ que expresan GFP::PacC(5-678) (Fig. 35A) se detectaron dos complejos de retardamiento mayoritarios. Si bien en condiciones de cultivo ácidas los niveles de ambos complejos fueron muy similares, a medida que se aumentó el pH del medio de cultivo aumentaron los niveles del complejo de mayor movilidad electroforética (complejo III) aparentemente a expensas del complejo de menor movilidad (complejo IV), presumiblemente formado por el producto primario de traducción, de forma que a pH alcalino (pH 7,8) el complejo III fue claramente predominante. Estos resultados, que son consistentes con los resultados obtenidos por *western* descritos

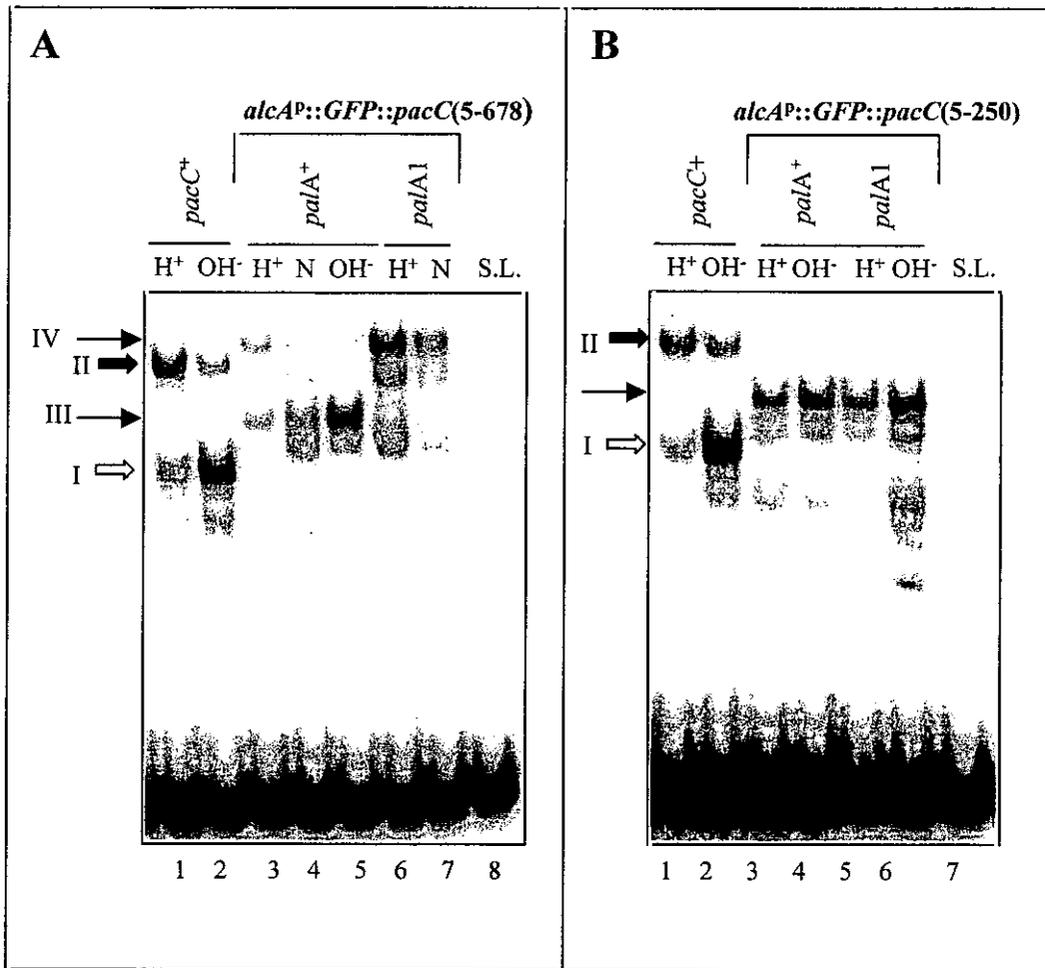


Figura 35. Análisis por EMSA de proteínas recombinantes GFP::PacC. Se analizaron los mismos extractos de las estirpes recombinantes *alcA^P::GFP::PacC(5-678)* (A) o *alcA^P::GFP::PacC(5-250)* (B) analizados por *western* en la figura 34. Como control se muestran en ambos paneles (carriles 1 y 2) los complejos PacC-DNA que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC⁺*) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido o alcalino suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada (I) y el producto primario de traducción PacC (II), respectivamente. Las flechas normales indican los complejos formados tras la expresión de GFP::PacC(5-678) (III y IV, panel A) o GFP::PacC(5-250) (panel B). S.L., sonda libre. H⁺, pH ácido. OH⁻, pH alcalino. N, pH neutro.

anteriormente, muestran que la presencia de GFP en el extremo amino terminal de PacC no previene su unión al DNA. En un fondo mutante *palA1* tras la inducción de *GFP::pacC(5-678)* se detectaron, en ambas condiciones de cultivo, ácidas y neutras (recuérdese que las estirpes *palA⁻* no crecen a pH alcalino), niveles elevados del complejo IV así como niveles mucho más reducidos de otros complejos de menor movilidad electroforética (Fig. 35A) alguno de los cuales se corresponde casi con certeza a las proteínas de menor *M_r* detectadas por *western*

(Fig.34A). El hecho de que en un fondo *palA1* la movilidad de uno de los complejos minoritarios fuera muy similar a la del complejo III y de que la relación entre los niveles del complejo IV y los niveles de los otros complejos aparentemente no cambiara al aumentar el pH del medio de cultivo, sugiere que una fracción del producto primario de traducción puede procesarse en un fondo genético *palA1* de manera independiente del pH ambiental. En extractos de las estirpes *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* (Fig. 35B) se detectaron, tanto en los dos fondos genéticos (*palA⁺* o *palA1*) como en las dos condiciones de cultivo, niveles muy parecidos de un complejo mayoritario formado por el producto primario de traducción, lo que indica, al igual que el análisis por *western* de PacC en estos mismos extractos, que la proteína GFP::PacC(5-250) no se procesa cualquiera que sea el fondo genético (*palA⁺* o *palA⁻*) o el pH ambiental.

Los transformantes con el transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-678)* en los fondos *palA⁺* y *palA⁻* se cultivaron nuevamente en las mismas condiciones a las descritas anteriormente, salvo que la inducción se hizo en un medio tamponado a pH ácido o pH neutro, con el fin de obtener las fracciones nuclear y citoplásmica. La figura 36 muestra cómo en ambos casos el análisis de la distribución subcelular de PacC (detectado por EMSA) en las fracciones nuclear y citoplásmica confirmó los resultados obtenidos *in vivo* por microscopía de fluorescencia. Así, en el fondo *palA1*, si bien los niveles de PacC en condiciones de cultivo ácidas fueron mayores que los observados en condiciones de cultivo neutras, los resultados obtenidos fueron muy parecidos en ambas condiciones, de forma que, en ambos casos, tanto con la fracción "total" como con la citoplásmica se detectó mayoritariamente el complejo IV (formado por el producto primario de traducción) siendo sus niveles muy superiores a los observados en la fracción nuclear. Con esta última fracción, a diferencia de lo que ocurrió con las otras dos, se detectaron niveles apreciables de la forma procesada del producto primario de traducción (que forma el complejo III). Estos resultados indican que si bien la mutación *palA1* (que bloquea el procesamiento del producto primario de traducción) provoca la localización citoplásmica preferente del producto primario de traducción, tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras, a diferencia de lo que ocurre con la proteína PacC(5-678), una pequeña fracción de la proteína GFP::PacC(5-678) se localiza en el núcleo. Por otro lado la pequeña proporción de proteína que se procesa correctamente se localiza preferentemente en el núcleo, lo que proporciona una explicación plausible a porqué la fluorescencia resultante de la expresión de GFP::PacC(5-678) en este fondo genético no se localiza exclusivamente en el citoplasma. Con la fracción total correspondiente al fondo *palA⁺* se detectaron ambos complejos de retardamiento (complejos III y IV) tanto en condiciones de cultivo ácidas como neutras siendo el complejo IV predominante en condiciones de cultivo ácidas y el complejo III predominante en condiciones de cultivo neutras. En ambas condiciones de cultivo la proteína procesada (complejo III) se detectó preferentemente en la fracción nuclear, de acuerdo con todos los resultados expuestos anteriormente de fraccionamiento subcelular de la forma procesada de PacC, y en condiciones

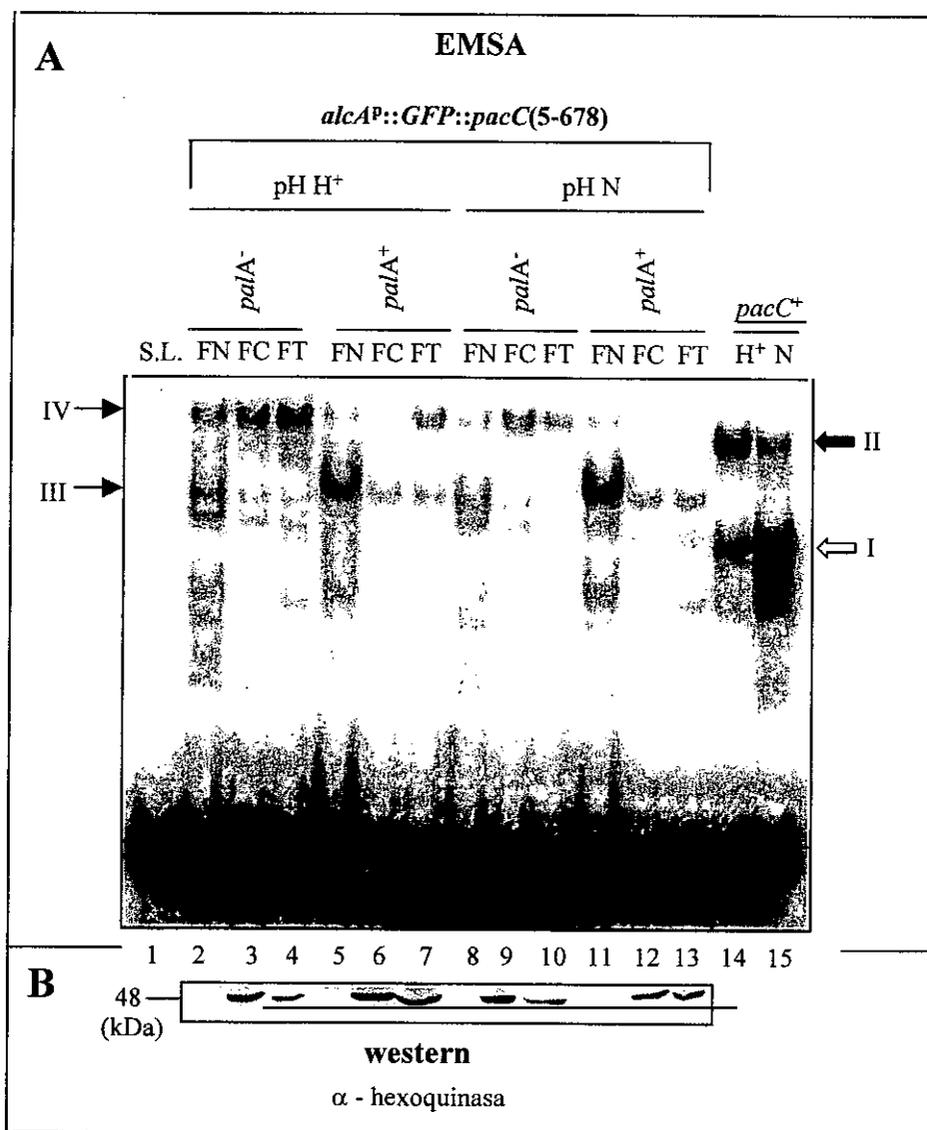


Figura 36. Distribución entre los compartimentos nuclear y citoplásmico de PacC en función del pH ambiental. (A) Análisis por EMSA de PacC en un extracto total (ET) y en extractos de la fracción nuclear (FN) y citoplásmica (FC) de los recombinantes *alcA^P::GFP::PacC(5-678)* en los fondos genéticos *palA1* o *palA*⁺. Las estirpes se cultivaron 14 horas en MFA ácido en condiciones de cultivo represoras (glucosa 3% (p/v) y 8 horas adicionales en condiciones de inducción en MFA tamponado a pH ácido (H⁺, pH final 5.9) o neutro (N, pH final 6.9). Como control se muestran los complejos que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC*⁺) cultivada 24 horas en MFA ácido o neutro suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono (carriles 14 y 15). Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada (I) y el producto primario de traducción PacC (II), respectivamente. Las flechas normales indican los complejos formados tras la expresión de GFP::PacC(5-678) (III y IV). (B) Análisis por western con un antisuero anti-hexoquinasa en los mismos extractos analizados por EMSA.

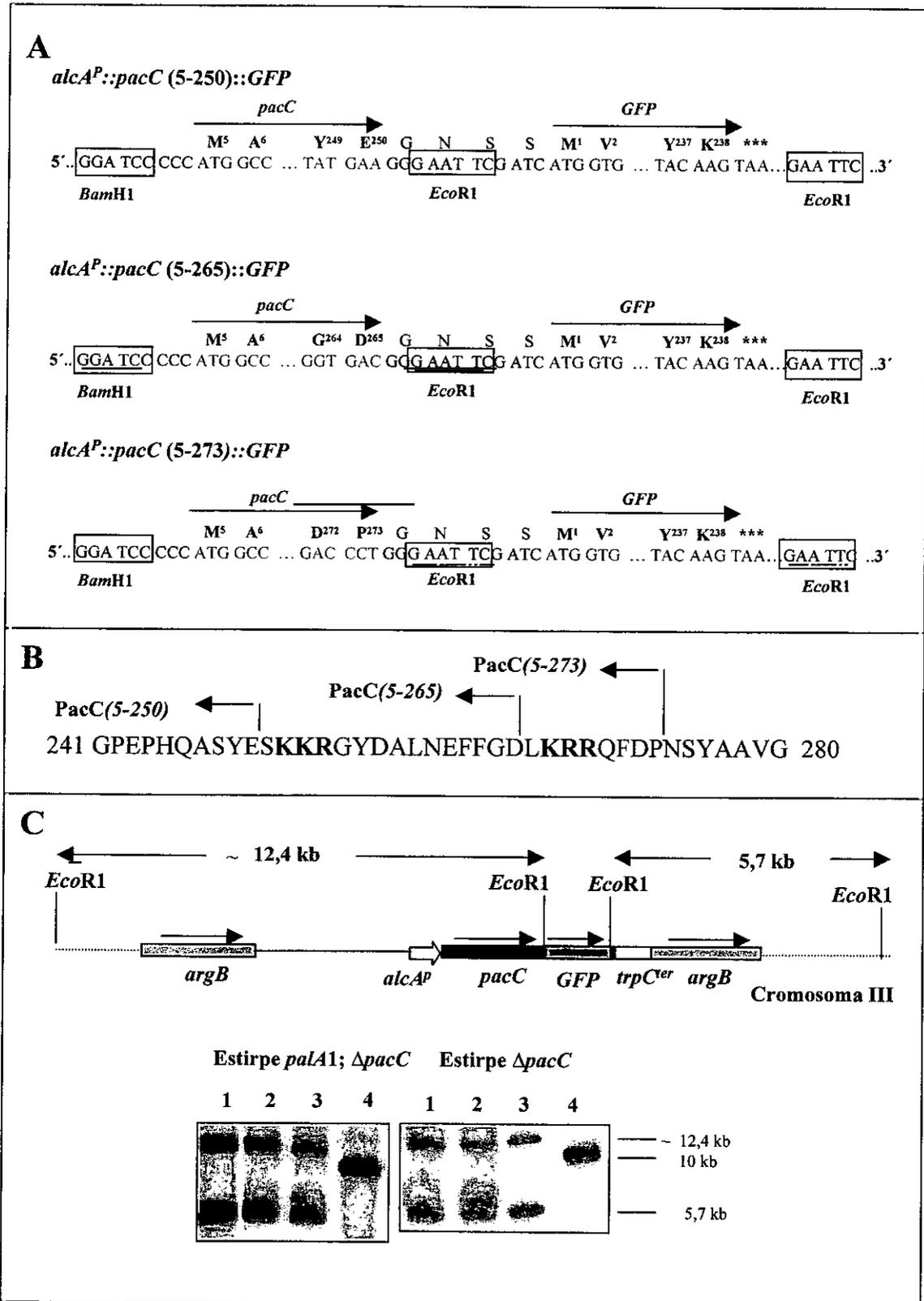
de cultivo ácidas, a diferencia de lo que ocurrió en condiciones de cultivo neutras, parte del complejo IV se detectó con la fracción citoplásmica, lo que explica la fluorescencia citoplásmica en estas condiciones (Fig. 33A). Estos resultados confirman los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia y muestran que ambas técnicas son válidas para el estudio de la localización subcelular de PacC.

Los resultados del estudio *in vivo* de la localización subcelular de PacC en respuesta al pH ambiental están de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de la distribución nucleo-citoplásmica de PacC en estirpes con distintas mutaciones que afectan al sistema regulador por pH (sección 2.1 de resultados) y confirman que el pH ambiental regula la localización subcelular de PacC y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para esta regulación.

2.3 Los dedos de zinc de PacC son suficientes para localizar la forma procesada de la proteína en el núcleo.

2.3.1 La secuencia 252-KKR...KRR269 no es necesaria para la localización nuclear de la forma procesada de PacC.

Las señales de localización nuclear (NLSs) de tipo bipartito constan de dos agrupaciones de residuos básicos separadas por una cadena de 10 a 12 aminoácidos (revisado por Boulikas *et al.*, 1994; Jans y Hübner 1996). El límite carboxilo terminal de la forma procesada de PacC se encuentra en la secuencia $K^{252}K^{253}R^{254}$ o en una zona muy próxima a esta secuencia (sección 1.3 de resultados). Este agrupamiento de aminoácidos básicos está separado por 12 aminoácidos de otra agrupación de residuos básicos situada en posición más carboxilo terminal, $K^{267}R^{268}R^{269}$, por lo que la secuencia 252-KKR...KRR-269 se ajusta perfectamente a la secuencia consenso de una NLS de tipo bipartita. El hecho de que la segunda mitad de esta secuencia esté ausente en la forma procesada de PacC nos hizo dudar sobre su papel como NLS, al menos para la forma procesada de PacC. Con objeto de estudiar si esta secuencia o la primera parte de la misma (primera agrupación de residuos básicos) es necesaria para la localización nuclear de formas truncadas de PacC semejantes en tamaño a la forma procesada de la proteína se obtuvieron los plásmidos $p[alcA^P::pacC(5-250)::GFP]$, $p[alcA^P::pacC(5-265)::GFP]$ y $p[alcA^P::pacC(5-273)::GFP]$ (Fig. 37A) que dirigen la expresión bajo $alcA^P$ de versiones de PacC truncadas antes, en un punto intermedio y después de la supuesta NLS, respectivamente, fusionadas por su extremo carboxilo terminal a la GFP. Cada una de estas construcciones se introdujo, mediante técnicas de transformación estándar, en estirpes $\Delta pacC$ y $\Delta pacC; palA1$, seleccionándose en los dos fondos genéticos transformantes



con copias únicas de los distintos plásmidos integrados en el *locus argB*, mediante la técnica de Southern (Fig. 37C). Mientras que en condiciones de cultivo represoras para el promotor no se detectó fluorescencia apreciable debida a la GFP en ninguno de los transformantes (resultados no mostrados), en condiciones de inducción la expresión de cualquiera de estas construcciones en un fondo genético *pal^r* resultó en una localización nuclear casi exclusiva de la fluorescencia debida a la GFP (Fig. 38A), indicando que las tres proteínas quiméricas se localizan preferentemente en los núcleos (identificados como tales mediante tinción con DAPI (Fig. 39)). Los resultados obtenidos en un fondo *palA1* (Fig. 38B), indistinguibles de los obtenidos en el fondo *palA⁺*, indican que la transducción de la señal de pH ambiental alcalino no es necesaria para la localización preferentemente nuclear de estas versiones truncadas de PacC. Estos resultados muestran, por tanto, que la secuencia 252-KKR...KRR-269 no es necesaria para la localización nuclear de versiones truncadas de PacC semejantes a la forma procesada de la proteína.

El análisis por *western* de extractos proteicos (Fig. 40A) usando un antisuero contra GFP mostró cómo en todos estos transformantes la mayor parte de la GFP se detectó formando parte del correspondiente producto primario de traducción y que solamente una parte minoritaria se encontró como proteínas de tamaño ligeramente superior a la GFP que probablemente procedían del procesamiento proteolítico de las proteínas de fusión expresadas (*vide infra*). Con este antisuero (anti-GFP) los niveles de PacC(5-250)::GFP en los dos fondos genéticos fueron claramente mayores que los de las otras dos proteínas recombinantes. El mismo tipo de análisis de estos extractos utilizando un antisuero contra el extremo amino terminal de PacC (fig. 40B) mostró unos resultados muy similares, de forma que en todos los transformantes la mayor parte de la proteína PacC formaba parte del correspondiente producto primario de traducción y solamente una parte minoritaria formaba parte de otras proteínas de menor tamaño. La movilidad electroforética de tres de estas proteínas de menor tamaño (las

Figura 37. Caracterización de estirpes recombinantes en los fondos *palA⁺* y *palA1* con una copia única de los transgenes *alcA^P::pacC(5-250)::GFP*, *alcA^P::pacC(5-265)::GFP* o *alcA^P::pacC(5-273)::GFP* integrada en el *locus argB*. (A) secuencia de una región de los transgenes mencionados que muestra los extremos 5' y 3' de las ORFs del gen *GFP* (en verde) y de los correspondientes alelos *pacC* (en azul), así como los sitios de restricción que se utilizaron para su clonaje en el plásmido pALC. (B) secuencia de de una región de *PacC* en la que se muestra el residuo carboxilo terminal de las regiones de *PacC* fusionadas a *GFP*. En negrita se resaltan las dos agrupaciones de residuos básicos de la secuencia 252-KKR..KRR-269. (C) Parte superior, esquema de la integración de una única copia de los plásmidos p[*alcA^P::pacC(5-250, -265, -273)::GFP*] en el gen *argB* (cromosoma III). En él se indican los tamaños de los fragmentos de restricción revelados en el experimento de Southern. Parte inferior, hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *EcoRI*) de los transformantes de las estirpes indicadas con los transgenes *alcA^P::pacC(5-273)::GFP* (carriles 1), *alcA^P::pacC(5-265)::GFP* (carriles 2) o *alcA^P::pacC(5-250)::GFP* (carriles 3) utilizando una sonda para *argB*. Como control se emplearon los DNAs de las estirpes receptoras (carriles 4).

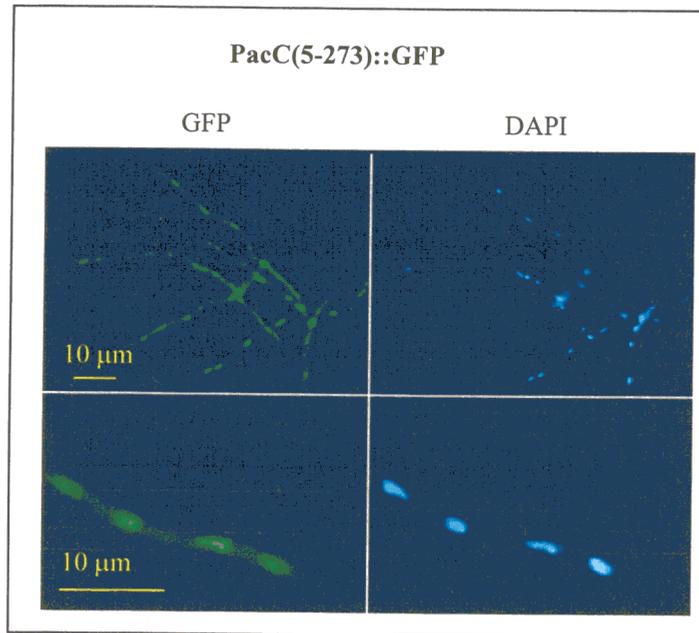


Figura 39. Identificación de núcleos en una estirpe recombinante *alcA^P::pacC(5-273)::GFP; ΔpacC*. Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio recogidas tras 20 h de cultivo en MFA ácido en condiciones de inducción para *alcA^P*. El micelio se fijó con formaldehído (3.5%) y se tiñó con DAPI (0.031 μg/ml). Las imágenes se tomaron utilizando filtros apropiados para la detección de la fluorescencia de la GFP (1 segundo de exposición) o del DAPI (3 segundos de exposición). Parte superior, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos.

mayoritarias) era igual en todos los transformantes, coincidiendo además el tamaño de la mayor de estas proteínas con el tamaño de la forma procesada de PacC. Estos resultados, sugieren que las tres proteínas quiméricas se procesan parcialmente dando lugar, aunque ineficientemente, a una versión de igual tamaño que la forma procesada de PacC y que la secuencia o motivo estructural de PacC reconocida por la proteasa procesativa debe estar situada en una zona más amino terminal del aminoácido 250 y, por tanto, más amino terminal del sitio de corte de esta proteasa. Al contrario que lo ocurrido con el antisuero contra GFP, los niveles de las tres proteínas recombinantes detectados con el antisuero contra PacC fueron muy similares en un mismo fondo genético lo que sugiere que las diferencias detectadas con el antisuero contra GFP pueden ser debidas a que éste reconozca mejor sus epítomos diana en la proteína PacC(5-250)::GFP que en las otras proteínas recombinantes.

El análisis por EMSA de estos mismos extractos (Fig. 41) mostró más claramente que el análisis por *western* cómo en ambos fondos genéticos las tres proteínas recombinantes se procesan y que el tamaño del complejo DNA-proteína correspondiente a una de las formas

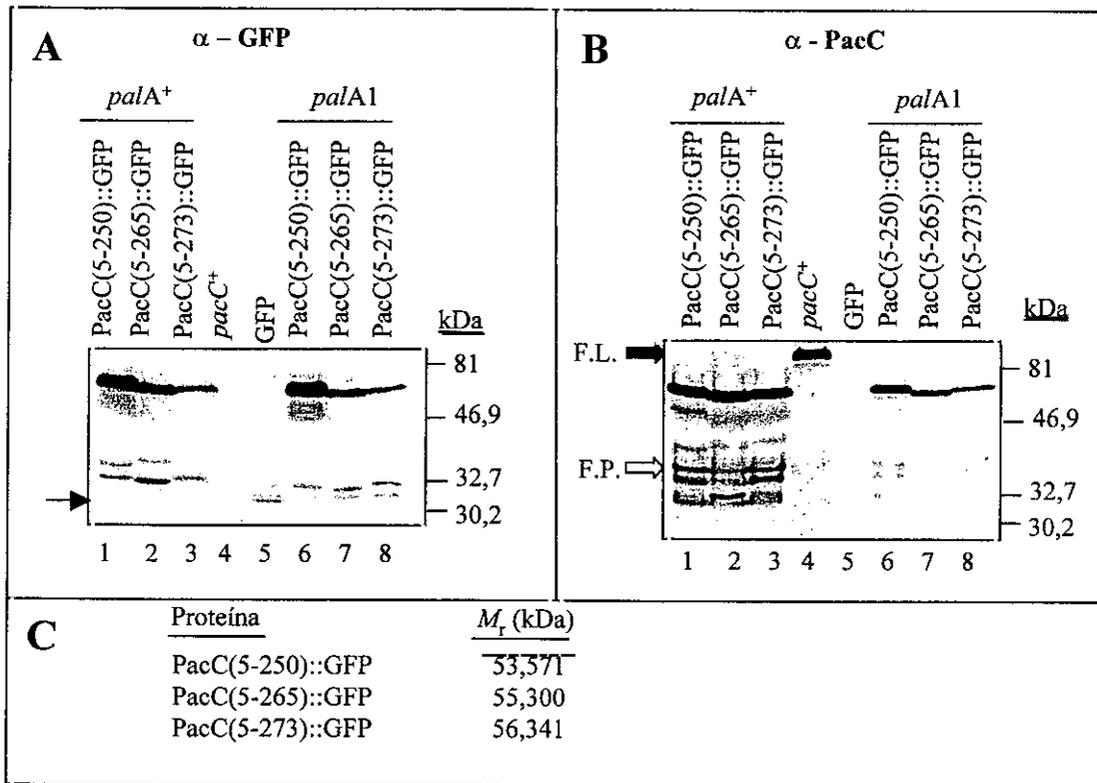


Figura 40. Análisis por *western* de las proteínas recombinantes PacC(5-250, -265, -273)::GFP. Se analizaron extractos proteicos de estirpes recombinantes con los transgenes *alcA^P:: pacC(5-250, -265, -273)::GFP* en los fondos *palA⁺* y *palA1* obtenidos tras los cultivos en condiciones de inducción descritos en la figura 36. Se utilizaron antisueros contra GFP (α - GFP, (A)) y contra el extremo amino terminal de PacC (α - PacC, (B)). Con cada antisuero se utilizó una membrana independiente. Como controles, se muestran las proteínas detectadas por los antisueros en un extracto de una estirpe silvestre (*pacC⁺*) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% como principal fuente de carbono y en un extracto de la estirpe *alcA^P::GFP ; $\Delta pacC$* (GFP) cultivada 20 horas a 37°C en MFA ácido en condiciones de inducción para *alcA^P*. Las flechas de bloque blanca y negra indican la forma procesada de PacC (F.P.) y el producto primario de traducción (F.L.), respectivamente. La flecha negra (parte inferior del panel A) indica la proteína GFP. (C) M_r de las proteínas indicadas.

procesadas obtenidas es en todos los casos indistinguible del tamaño del complejo correspondiente a la forma procesada de PacC. Así, en los extractos de todos los transformantes se detectaron dos complejos mayoritarios, uno, el de menor movilidad electroforética (complejo III), formado por el producto primario de traducción del gen quimérico, cuya movilidad electroforética era tanto mayor cuanto menor era la M_r de la proteína codificada, y una triada de complejos correspondientes a proteínas de menor M_r , uno de los cuales (complejo I) fue mayoritario y mostró una movilidad electroforética indistinguible de la del complejo I formado por la forma procesada de PacC (en una estirpe *pacC⁺*). La relación entre los niveles del complejo I y los niveles del complejo III detectados por EMSA fue, en todos los

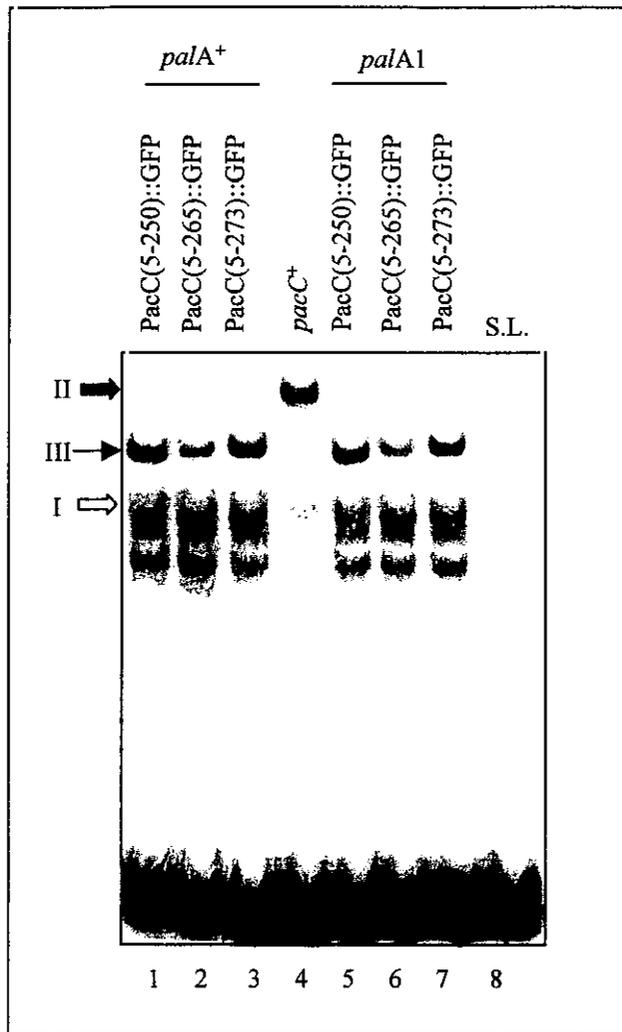


Figura 41. Análisis por EMSA de las proteínas recombinantes PacC(5-250, -265, -273)::GFP. Se analizaron los mismos extractos de las estirpes recombinantes con los transgenes *alcA^P::pacC(5-250, -265, -273)::GFP* analizados por *western* en la figura 40. Como control se muestran en ambos paneles (carriles 1 y 2) los complejos PacC-DNA que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC⁺*) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción (II), respectivamente. La flecha normal indica los complejos PacC-DNA (III) formados por las proteínas de fusión indicadas sobre cada carril. S.L., sonda libre.

transformantes, claramente mayor que la relación entre los niveles de la proteína procesada y sin procesar detectadas por la técnica de *western*, lo que podría sugerir que o bien la afinidad de la proteína de fusión no procesada por la sonda es menor que la de la correspondiente forma procesada o bien que no toda la proteína recombinante puede unirse al DNA formando el correspondiente complejo de retardamiento. En este último caso podría ocurrir que parte del

producto primario de traducción formara parte de un complejo proteico que debido a su elevada M_r fuera excluido del gel. Alternativamente, el antisuero contra el extremo amino terminal de PacC podría reconocer mejor su antígeno en el producto primario de traducción del alelo recombinante que en la correspondiente forma procesada.

El hecho de que la secuencia 252-KKR...KRR-269 no sea necesaria para la localización nuclear de versiones truncadas de PacC semejantes a la forma procesada de la proteína no descarta que esta secuencia esté implicada en la localización nuclear del producto primario de traducción de *pacC* (que en una estirpe *paI⁺* se reparte entre núcleo y citoplasma, *vide supra*). Por ello, se estudió si una región de PacC conteniendo esta secuencia más 10 aminoácidos adicionales hacia el extremo amino terminal y 11 aminoácidos adicionales hacia el extremo carboxilo terminal era capaz de dirigir la localización de la GFP al núcleo. Para ello se construyó el plásmido p[*alcA^P::pacC(241-280)::GFP*] que dirige la expresión bajo *alcA^P* de la región de PacC mencionada anteriormente fusionada por su extremo carboxilo terminal a la GFP (Fig. 42A). Como en los casos anteriores, este plásmido se introdujo en estirpes *paIA1* y *paIA⁺* (ambas $\Delta pacC$) seleccionándose por análisis de Southern transformantes, bien con dos copias (fondo genético *paIA⁺*), bien con una copia (fondo genético *paIA1*) del plásmido integradas en el *locus argB* (Fig. 42B). La figura 43A muestra cómo en ambos transformantes, al igual que ocurre con el transformante *alcA^P::GFP* (sección 2.2 de resultados), la fluorescencia debida a la GFP se detectó por toda la hifa, indicando que la proteína se localizaba por igual tanto en el núcleo como en el citoplasma y no existía una localización nuclear preferente. El análisis por *western* de GFP en extractos proteicos (Fig. 43B) mostró cómo en ambos transformantes la mayor parte de la GFP detectada formaba parte de una proteína de fusión del tamaño esperado para el producto primario de traducción lo que indica que la fluorescencia no era debida a la presencia de GFP libre resultante, por ejemplo, de una proteólisis del producto primario de traducción. Estos resultados sugieren, por tanto, que la secuencia 252-KKR...KRR-269 no es una NLS.

El análisis fenotípico en medio sólido (Fig. 44) mostró que los transformantes de las dos estirpes receptoras ($\Delta pacC$ y *paIA1*; $\Delta pacC$) con la construcción *alcA^P::pacC(241-280)::GFP* son indistinguibles en los medios probados de una estirpe $\Delta pacC$ y que los transformantes de ambas estirpes receptoras con los transgenes *alcA^P::pacC(5-250)::GFP*, *alcA^P::pacC(5-265)::GFP* y *alcA^P::pacC(5-273)::GFP* son indistinguibles entre sí e indistinguibles de los transformantes de estas dos estirpes con la construcción *alcA^P::pacC(5-265)*. Así, crecen normalmente en un medio tamponado a pH ácido, tanto en condiciones represoras como inductoras para *alcA^P*, y a diferencia de una estirpe $\Delta pacC$ conidian normalmente. En un medio tamponado a pH alcalino la expresión de cualquiera de estos alelos (condiciones de inducción para el promotor) en cualquiera de los dos fondos genéticos suprime la extrema sensibilidad al

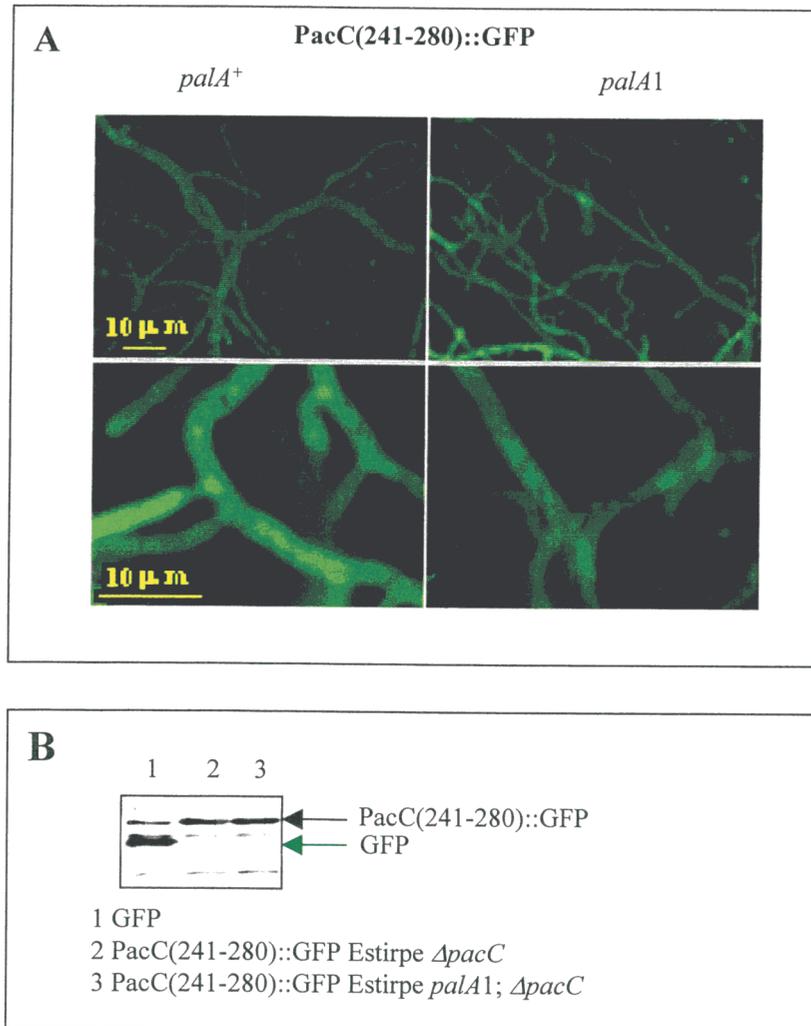


Figura 43. Localización subcelular *in vivo* de PacC(241-280)::GFP en los fondos *palA*⁺ y *palA1*. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de transformantes con el transgén *alcA*^P::*pacC*(241-280)::GFP tras 20 horas de cultivo en MFA ácido (pH final, 6.1), en condiciones de inducción para *alcA*^P. La exposición en todos los casos fue de 3 segundos. Parte superior de los paneles, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos. (B) Análisis por *western* utilizando un anticuerpo contra GFP de la proteína PacC(241-280)::GFP (flecha negra) en extractos proteicos correspondientes a estos cultivos. Como control, se muestran las proteínas detectadas en un extracto de la estirpe *alcA*^P::GFP; $\Delta pacC$ cultivada en las mismas condiciones (GFP). La flecha verde indica la proteína GFP.

pH ambiental alcalino resultante de la mutación $\Delta pacC$. Estos resultados indican que, al igual que el alelo *alcA*^P::*pacC*(5-265), los alelos *alcA*^P::*pacC*(5-250)::GFP, *alcA*^P::*pacC*(5-265)::GFP y *alcA*^P::*pacC*(5-273)::GFP (en condiciones de inducción), son epistáticos sobre la mutación

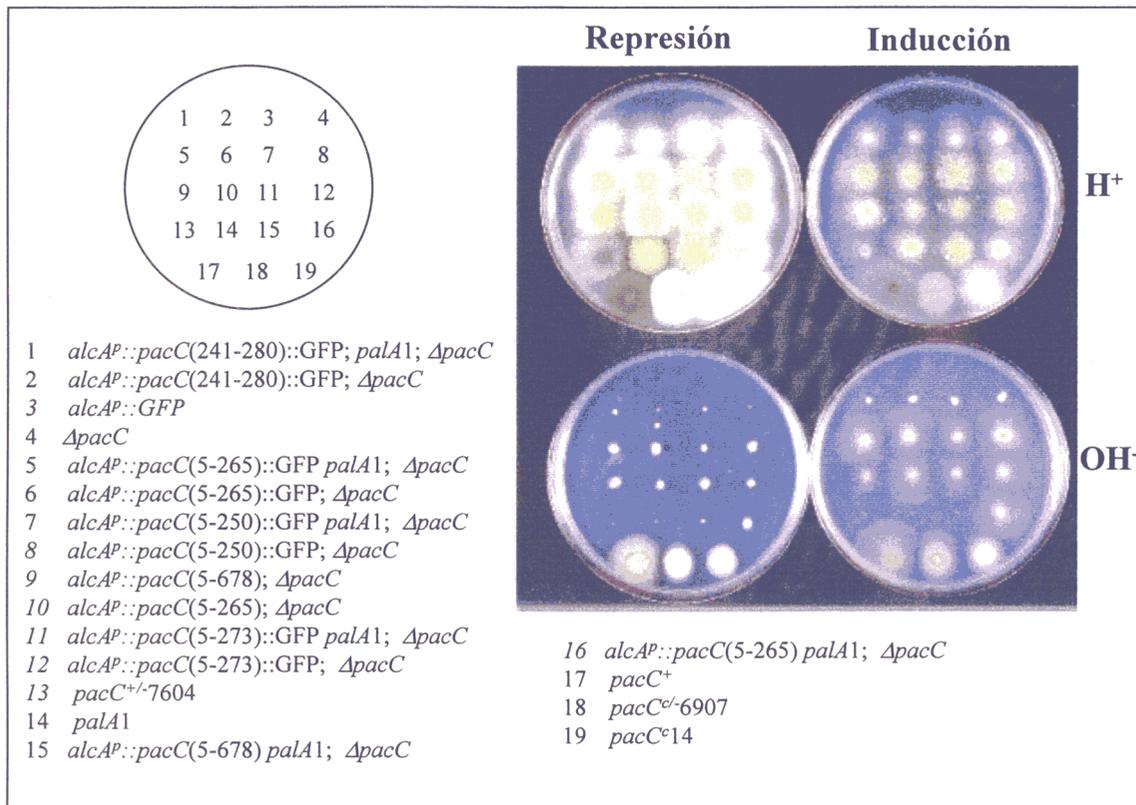


Figura 44. Análisis fenotípico en placa de transformantes de las estirpes *ΔpacC* y *palA1; ΔpacC* con los transgenes *alcA^P::pacC(5-250, -265, -273)::GFP* y *alcA^P::pacC(241-280)::GFP*. Los transformantes y las estirpes control indicadas se cultivaron en las mismas condiciones a las descritas en la figura 22.

palA1 y que la presencia de GFP en el extremo carboxilo terminal de las versiones truncadas de PacC codificadas por estos alelos no parece alterar drásticamente su función.

2.3.2 Los dedos de zinc de PacC son suficientes para dirigir la localización nuclear de GFP.

El transporte de moléculas hacia el interior o hacia el exterior del núcleo tiene lugar a través de los complejos del poro nuclear (NPCs). Mientras que proteínas de *M_r* inferior a 40-60 kDa en principio podrían difundir a través de los NPCs, proteínas de mayor tamaño deben ser “transportadas” para poder localizarse en el interior nuclear mediante un proceso que requiere energía y la presencia de una señal de importación al núcleo en la proteína (Görlich y Mattaj, 1996; Nigg 1997; Fujihara y Nadler, 1998). La localización preferentemente nuclear de las

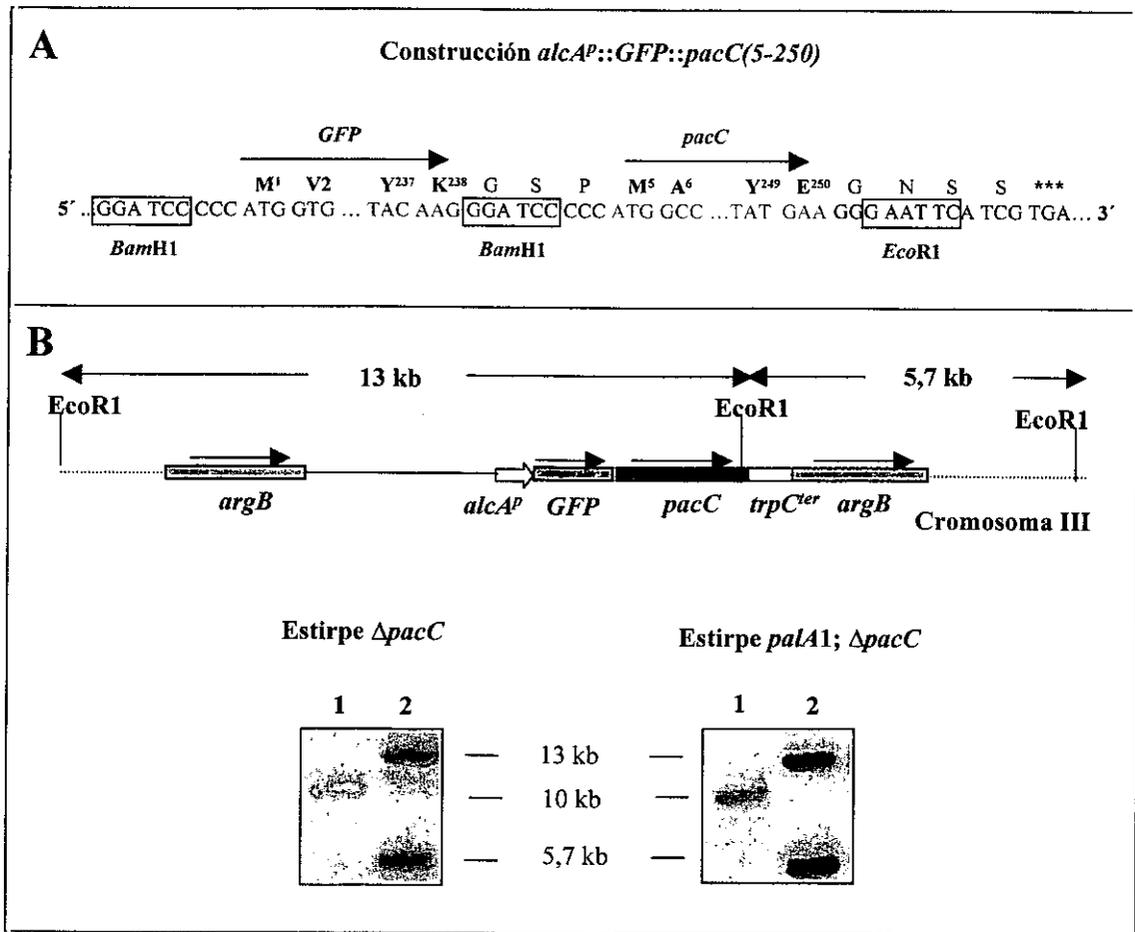


Figura 45. Caracterización de estirpes recombinantes en los fondos *palA⁺* y *palA1* con una copia única del transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* integrado en el locus *argB*. (A) secuencia de una región del plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-250)*] que muestra los extremos 5' y 3' de las ORFs del gen *GFP* (en verde) y del alelo *pacC(5-250)* (en azul), así como los sitios de restricción que se utilizaron para su clonaje en el plásmido pALC. (B) Esquema de la integración de una única copia del plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-250)*] en el gen *argB* (cromosoma III), en el que se indican los tamaños de los fragmentos de restricción revelados en el experimento de Southern. En la parte inferior se muestra la hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *Eco*R1) de los transformantes de las estirpes indicadas (carriles 2) utilizando una sonda para *argB*. Como control se emplearon los DNAs de las estirpes receptoras (carriles 1).

proteínas de fusión PacC(5-250)::GFP, PacC(5-265)::GFP y PacC(5-273)::GFP, cuya M_r estaría comprendida (si estuvieran en forma monomérica) entre 53,571 y 56,341 kDa (Fig. 40C) sugiere que en la región de PacC comprendida entre los aminoácidos 5 y 250 podría haber una señal de importación nuclear. Con objeto de verificar esta posibilidad y tratar de localizar con más precisión los supuestos determinantes de localización nuclear se estudió, en un fondo genético $\Delta pacC$ y mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular *in vivo* de

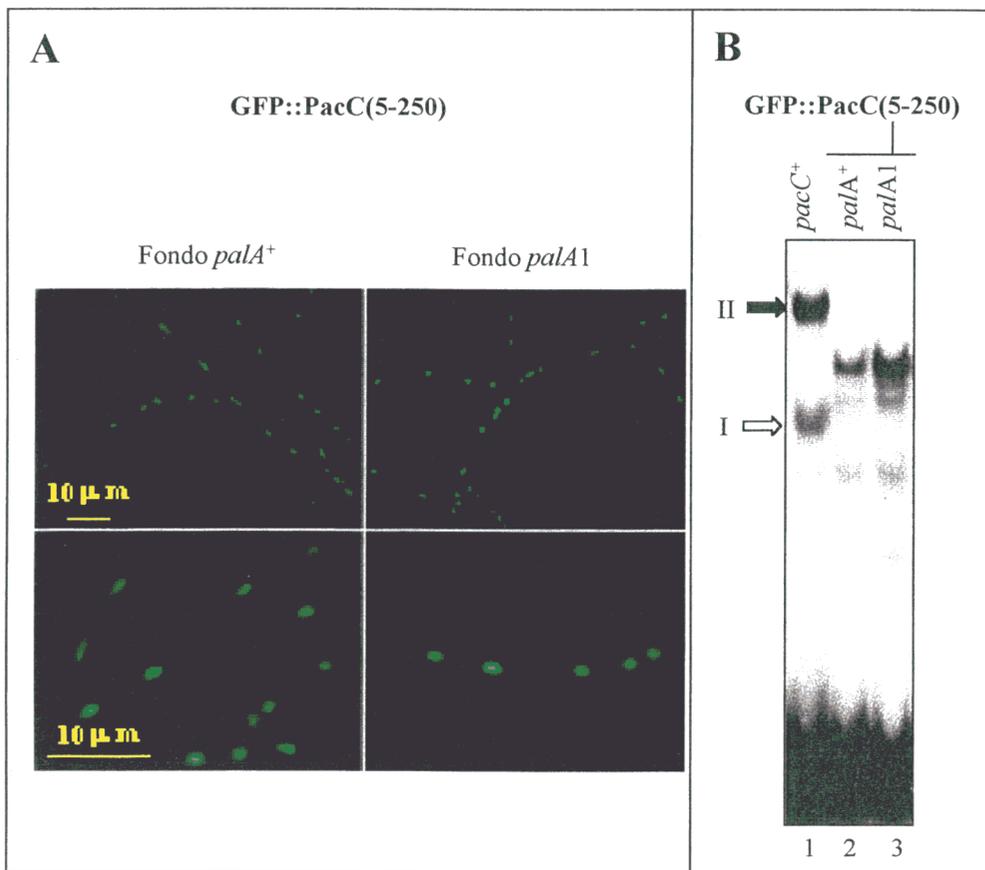
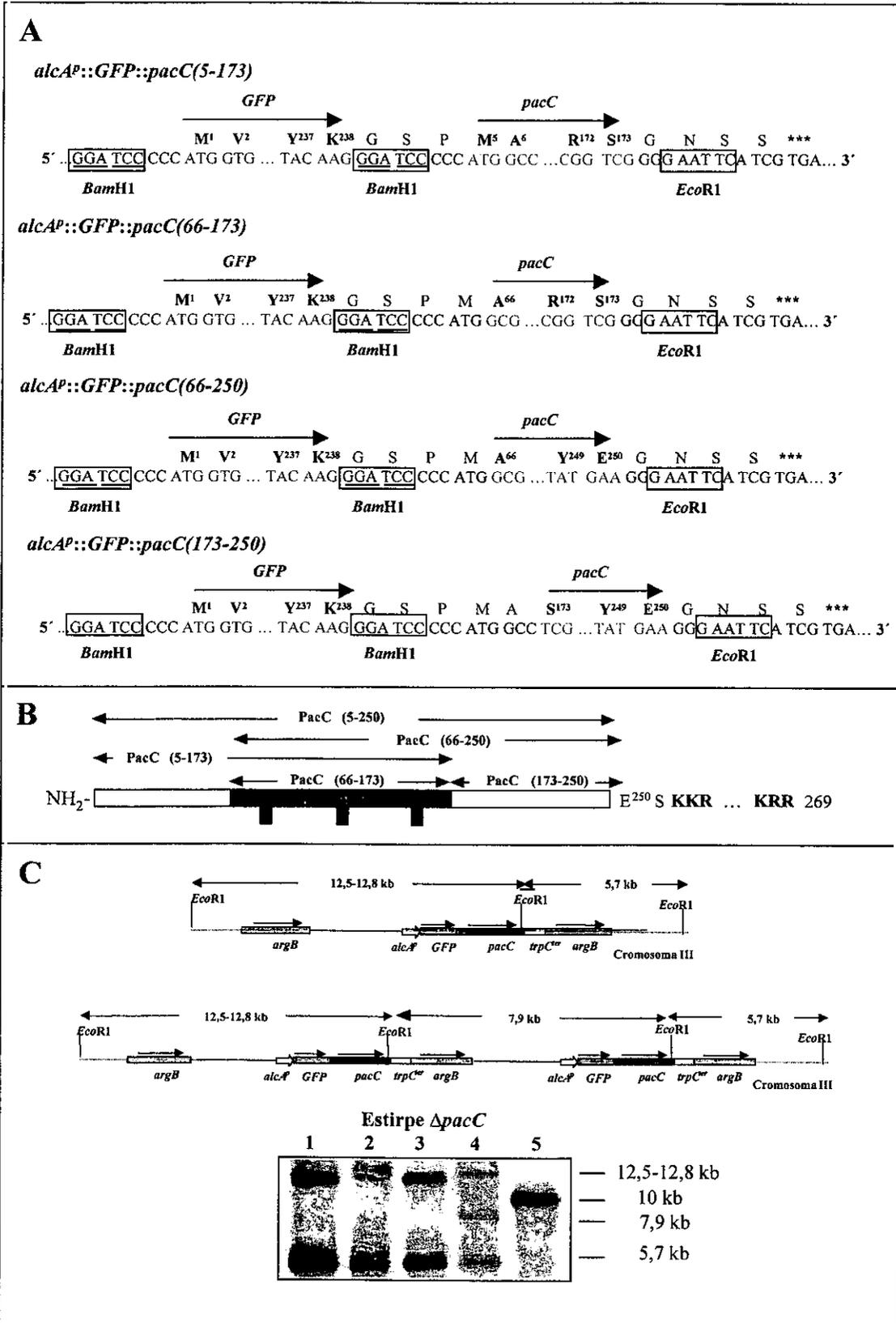


Figura 46. Localización subcelular *in vivo* de GFP::PacC(5-250). (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de los transformantes con el transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* en los fondos *palA1* y *palA*⁺. Las estirpes se cultivaron 20 horas a 37°C en MFA ácido, en condiciones de inducción (pH final, 6.1). La exposición en todos los casos fue de 2 segundos. Parte superior de los paneles, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos. (B) Análisis por EMSA de la proteína recombinante GFP::PacC(5-250) en extractos proteicos correspondientes a estos cultivos. Como control se muestran los complejos que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC*⁺) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada (I) y el producto primario de traducción PacC (II), respectivamente.

proteínas quiméricas formadas por GFP y distintas partes de la región amino terminal de PacC. Inicialmente se analizó si la inserción de GFP en el extremo amino terminal de una de las versiones de PacC estudiadas en la sección anterior (PacC (5-250)) podía mejorar los resultados obtenidos con la fusión de la GFP en el extremo carboxilo terminal en el sentido de prevenir el procesamiento o proteólisis del producto primario de traducción y disminuir, por tanto, el posible fondo causado por la presencia de proteínas de bajo peso molecular conteniendo GFP. Con este fin, se obtuvo el plásmido p[*alcA^P::GFP::pacC(5-250)*] (Fig. 45A) que fue introducido por transformación tanto en una estirpe $\Delta pacC$ como en una estirpe *palA1*; $\Delta pacC$, seleccionándose en ambos caso transformantes con una sola copia del transgén



integrada en el *locus argB* (Fig. 45B). La figura 46A muestra cómo en estos transformantes cultivados en condiciones de inducción, al igual que en los transformantes equivalentes con el transgén *alcA^P::pacC(5-250)::GFP* (Fig. 38), prácticamente toda la fluorescencia debida a la GFP se detectó en los núcleos. El análisis por EMSA de PacC en los correspondientes extractos proteicos (Fig. 46B), mostró cómo en ambos fondos genéticos la proteína GFP::PacC(5-250), a diferencia de PacC(5-250)::GFP (Fig. 41), no se procesó. A la vista de estos resultados se decidió que en las nuevas construcciones codificantes de proteínas de fusión a la GFP, ésta estuviera fusionada al extremo amino terminal de PacC. De esta forma se construyeron los plásmidos *p[alcA^P::GFP::pacC(5-173)]*, *p[alcA^P::GFP::pacC(66-173)]*, *p[alcA^P::GFP::pacC(66-250)]* y *p[alcA^P::GFP::pacC(173-250)]* (Fig. 47A). Cada uno de estos plásmidos se introdujo en una estirpe $\Delta pacC$ por transformación, seleccionándose estirpes transgénicas con dos copias (en el caso del plásmido *p[alcA^P::GFP::pacC(5-173)]*) o una sola copia (los otros plásmidos) integrada(s) en *argB* (Fig. 47C). Su análisis mediante microscopía (Fig. 48) mostró cómo tras la expresión de GFP::PacC(5-173), GFP::PacC(66-173) y GFP::PacC(66-250) la fluorescencia se localizó preferentemente en el núcleo, mientras que al expresar GFP::PacC(173-250), al igual que ocurre al expresar GFP en un fondo $\Delta pacC$, la fluorescencia resultante se detectó uniformemente por toda la hifa. Las tres primeras proteínas quiméricas contienen una región de PacC común, la región de los dedos de zinc (que en el caso de la proteína GFP::PacC(66-173) es la única región de PacC presente), mientras que la proteína GFP::PacC(173-250) es la única de estas cuatro proteínas de fusión que no contiene los dedos de zinc de PacC. Estos resultados muestran, por tanto, que la presencia de los dedos de zinc de PacC es suficiente para la localización nuclear de GFP.

Figura 47. Caracterización de estirpes recombinantes *palA⁺* con dos copias del transgén *alcA^P::GFP::pacC(5-173)* o una única copia de los transgenes *alcA^P::GFP::pacC(66-173)*, *alcA^P::GFP::pacC(66-250)* o *alcA^P::GFP::pacC(173-250)*, integradas en el *locus argB*. (A) secuencia de una región de los transgenes mencionados que muestra los extremos 5' y 3' de las ORFs del gen *GFP* (en verde) y de la correspondiente región de la ORF de *pacC* (en azul), así como los sitios de restricción que se utilizaron para su clonaje en el plásmido pALC. (B) Esquema de la región-amino terminal de PacC que muestra los límites amino- y carboxilo-terminales de las versiones de PacC que se indican. En negrita se resaltan las dos agrupaciones de residuos básicos de la secuencia 252-KKR..KRR-269. (C) Parte superior, esquemas de la integración de una (esquema superior) o dos copias (esquema inferior) de las construcciones indicadas en el panel A en el gen *argB* (cromosoma III), en los que se indican los tamaños de los fragmentos de restricción revelados en el experimento de Southern. Parte inferior, hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *EcoRI*) de los transformantes con los transgenes *alcA^P::GFP::pacC(66-173)* (carril 1), *alcA^P::GFP::pacC(66-250)* (carril 2), *alcA^P::GFP::pacC(173-250)* (carril 3) y *alcA^P::GFP::pacC(5-173)* (carril 4) utilizando una sonda para *argB*. Como control se empleó el DNA de la estirpe receptora (carril 5).

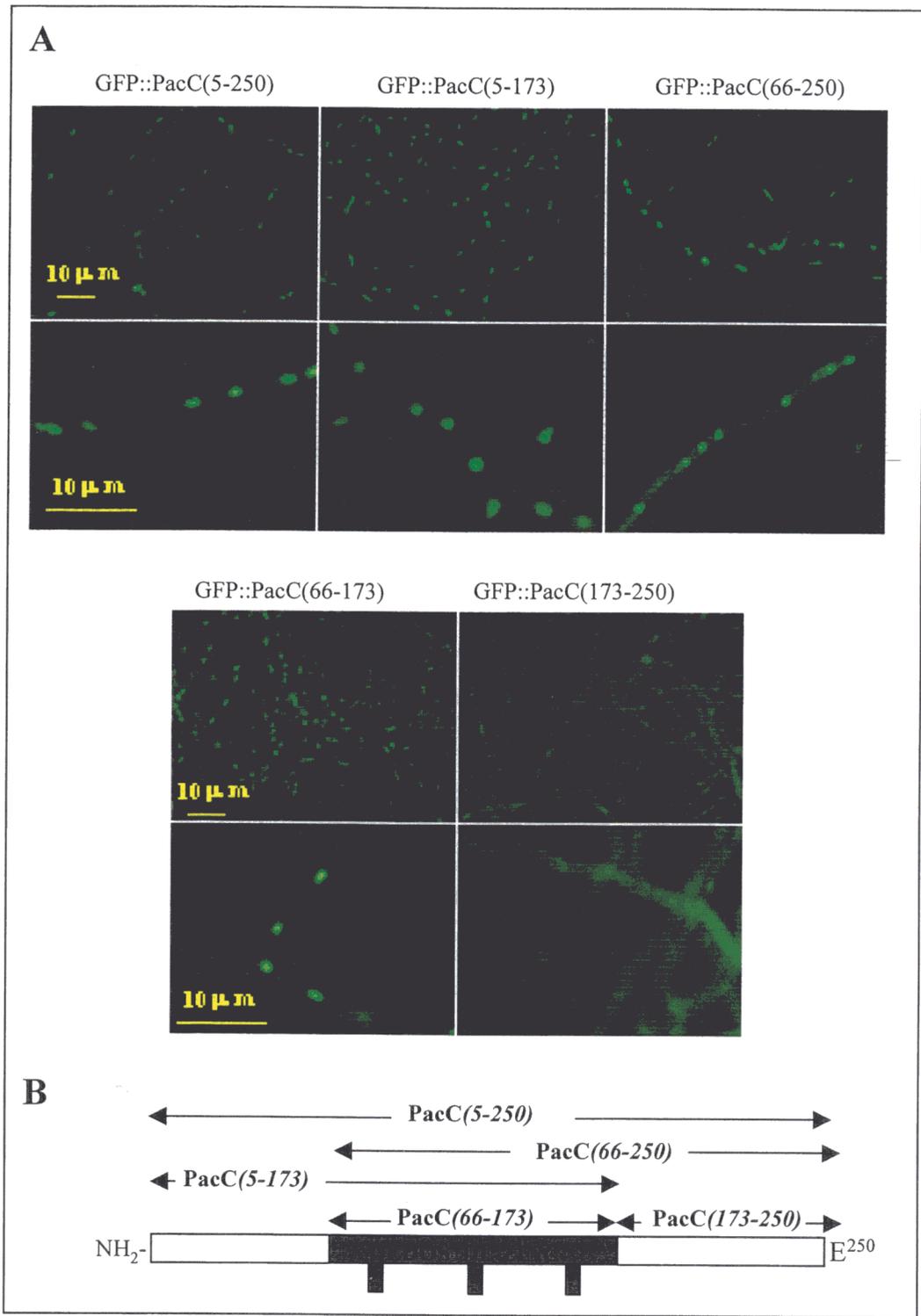


Figura 48. Localización subcelular *in vivo* de diferentes polipéptidos de la región amino terminal de PacC en un fondo *palA*⁺. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de micelio de transformantes expresando las proteínas que se indican. Las estirpes se cultivaron durante 20 horas en MFA ácido (pH final, 6.1-6.3) en condiciones de inducción para *alcA*^P. La exposición en todos los casos fue de 3 segundos. Parte superior de los paneles, 400 aumentos. Parte inferior, 1000 aumentos. (B) Esquema de la región amino terminal de PacC indicando los límites amino- y carboxilo- terminal de los polipéptidos de PacC analizados.

El análisis por *western* de PacC en extractos proteicos (Fig. 49A parte superior) mostró cómo en estos transformantes el antisuero anti-PacC reveló casi exclusivamente la correspondiente proteína de fusión con el tamaño esperado para el producto primario de traducción. El antisuero anti-GFP (fig. 49A parte inferior) tampoco detectó en extractos de ninguno de estos transformantes la existencia de GFP que no estuviera formando parte del correspondiente producto primario de traducción. Es digno de mención el hecho de que si bien con ambos antisueros se detectaron niveles parecidos de las proteínas GFP::PacC(66-173) y GFP::PacC(66-250) los niveles de las otras dos proteínas de fusión variaron en función del antisuero utilizado, de forma que el antisuero contra GFP reconoció especialmente bien los epítomos diana en la proteína GFP::PacC(5-173) mientras que el antisuero contra PacC reconoció especialmente bien sus dianas en la proteína GFP::PacC(173-250). La mayor movilidad electroforética detectada con ambos antisueros de la proteína GFP::PacC(66-250) (48,207 kDa) con respecto a GFP::PacC(5-173) (45,457 kDa) probablemente sea debida a la diferente composición aminoacídica de ambas proteínas (ver sección 1.3 de resultados).

El análisis por EMSA de PacC en estos mismos extractos (Fig. 49B) mostró cómo, en absoluta correlación con los resultados anteriores, en los transformantes que expresaban proteínas de fusión conteniendo los dedos de zinc de PacC se detectó un complejo de retardamiento mayoritario, correspondiente a las proteínas de fusión GFP::PacC, no detectándose lógicamente ningún complejo de retardamiento con extractos del transformante *alcA^P::GFP::pacC(173-250)* (este alelo codifica una proteína que carece del dominio de unión al DNA de PacC). Sorprendentemente, la movilidad de los complejos de retardamiento formados por las proteínas GFP::PacC(66-173) (39,878 kDa) y GFP::PacC(66-250) (48,207 kDa) fue anormalmente elevada con respecto a la movilidad electroforética del complejo I formado por la forma procesada de PacC (26,7-26,9 kDa). Así, la movilidad del complejo correspondiente a GFP::PacC(66-173) fue notablemente mayor que la movilidad del complejo I y la del complejo correspondiente a GFP::PacC(66-250) ligeramente mayor. Según lo esperado la movilidad del complejo formado por la proteína GFP::PacC(5-173) (45,457 kDa) fue menor que la del complejo I, pero anormalmente menor que la del complejo formado por la proteína GFP::PacC(66-250). Una característica común de las proteínas GFP::PacC(66-173) y GFP::PacC(66-250) que las diferencia de la forma procesada de PacC y de la proteína GFP::PacC(5-173) es que ambas carecen de la región de PacC rica en alaninas (19 de los 61 residuos de esta región son alaninas) comprendida entre los aminoácidos 5 y 65. Por tanto, la ausencia de esta región en estas dos proteínas de fusión podría ser responsable de la movilidad electroforética anormalmente elevada de sus respectivos complejos de retardamiento con respecto a la movilidad del complejo I. Una posible explicación podría ser que PacC no se uniera al DNA como un monómero sino asociado con otra u otras proteínas, y que la región rica en alaninas fuera necesaria para establecer las interacciones proteína-proteína. De hecho, al

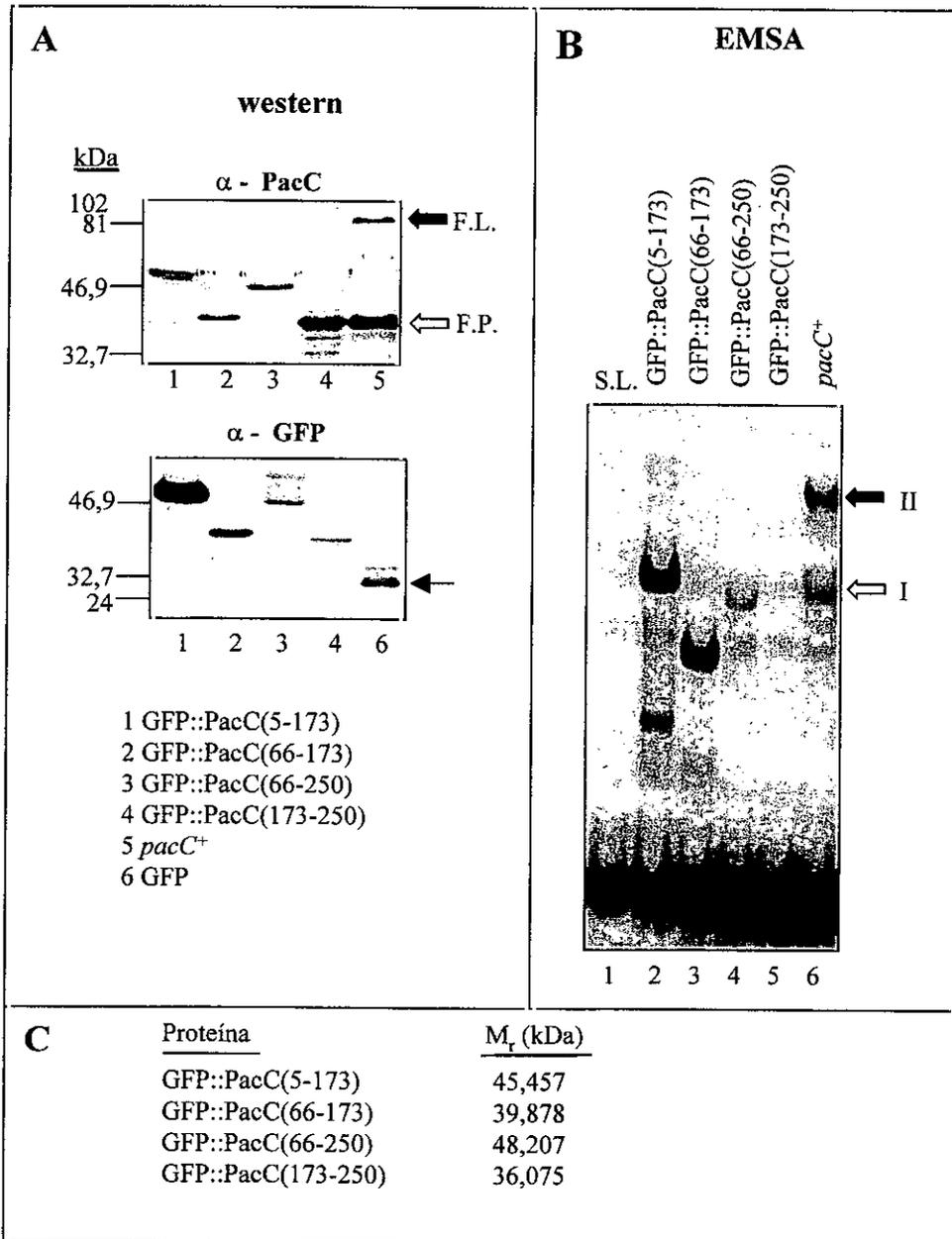


Figura 49. Análisis de proteínas de fusión que entre GFP y distintos polipéptidos de la región amino terminal de PacC. (A) Análisis por *western* utilizando antisueros contra la región amino terminal de PacC (α - PacC, parte superior) o contra GFP (α - GFP, parte inferior). Se analizaron extractos proteicos de estirpes recombinantes *palA*⁺ que expresaban las proteínas que se indican. Los extractos se obtuvieron de micelios procedentes de los cultivos descritos en la figura 48. Como control, se muestran las proteínas detectadas con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC*⁺) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% como principal fuente de carbono (carril 5, *western* α - PacC) y con un extracto de la estirpe *alcA*^P::GFP; Δ *pacC* (GFP) cultivada 20 horas a 37°C en MFA ácido en condiciones de inducción para *alcA*^P (carril 5, *western* α - GFP). Las flechas de bloque blanca y negra indican la forma procesada de PacC (F.P.) y el producto primario de traducción de *pacC* (F.L.), respectivamente. La flecha negra (parte inferior del panel A) indica la proteína GFP. (B) Análisis por EMSA de los mismos extractos analizados en el panel A, incluyendo como control un extracto *pacC*⁺. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción de *pacC* (II), respectivamente. S.L., sonda libre. (C) M_r de las proteínas indicadas.

fraccionar un extracto proteico de una estirpe silvestre mediante una columna de filtración en gel, las dos formas de PacC (producto primario de traducción y forma procesada) eluyen en fracciones a las que eluyen proteínas con una M_r dos veces mayor que la estimada para cada una de estas proteínas (Elicer Díez comunicación personal), lo que sugiere que PacC podría encontrarse normalmente en forma homodimérica.

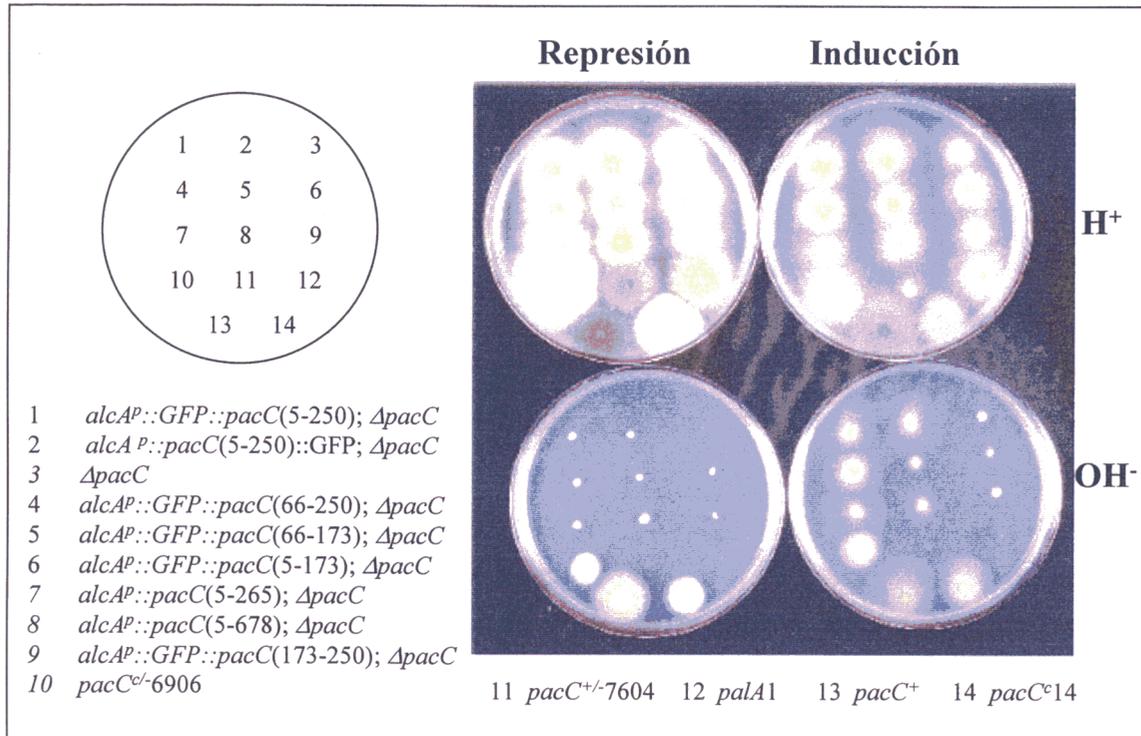


Figura 50. Análisis fenotípico en medio sólido de transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ con los transgenes *alcA^P::GFP::pacC(5-250)*, *alcA^P::GFP::pacC(5-173)*, *alcA^P::GFP::pacC(66-173)*, *alcA^P::GFP::pacC(66-250)* y *alcA^P::GFP::pacC(173-250)*. Los transformantes y las estirpes control indicadas se cultivaron en las mismas condiciones a las descritas en la figura 22.

El análisis fenotípico en medio sólido de estas cepas transgénicas (Fig. 50) mostró cómo los transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ con los transgenes *alcA^P::GFP::pacC(66-250)* y *alcA^P::GFP::pacC(5-250)* son indistinguibles, en los medios diagnósticos probados, de aquellos con los transgenes *alcA^P::pacC(5-250)::GFP* o *alcA^P::pacC(5-265)*, de forma que en un medio ácido, y tanto en condiciones de represión como de inducción para *alcA^P*, todos ellos crecieron normalmente y conidaron notablemente mejor que una estirpe $\Delta pacC$ y en condiciones de inducción para el promotor se suprimió la sensibilidad al pH ambiental alcalino resultante de la mutación $\Delta pacC$; el transformante *alcA^P::GFP::pacC(173-250)* (el único transgén que codifica

una proteína PacC que carece de los dedos de zinc) es indistinguible en estos análisis fenotípicos de la estirpe $\Delta pacC$ y los transformantes con las construcciones $alcA^p::GFP::pacC(66-173)$ o $alcA^p::GFP::pacC(5-173)$, que crecieron y conidieron notablemente mejor que la estirpe $\Delta pacC$ en condiciones de cultivo ácidas, son sin embargo indistinguibles de esta estirpe en cuanto a sensibilidad a pH alcalino, de acuerdo con el fenotipo de los mutantes clásicos con proteínas truncadas inmediatamente después de la región que contiene los dedos de zinc.

Estos resultados indican: i) que una proteína de fusión entre GFP y PacC(5-250) es funcional independientemente de que la GFP esté fusionada en el extremo amino o carboxilo terminal, ii) que para que un alelo $GFP::pacC$ (en condiciones de inducción) sea funcional en cuanto a la supresión de la sensibilidad al pH ambiental alcalino y los defectos de conidiación resultantes de la mutación $\Delta pacC$, debe incluir los dedos de zinc y la región comprendida entre los aminoácidos 173 y 250 y iii) que una versión de PacC conteniendo únicamente la región de los dedos de zinc fusionada a GFP es capaz de suprimir la falta de conidiación resultante de la mutación $\Delta pacC$ en un medio de cultivo ácido, lo que sugiere que en algunas condiciones solamente por el hecho de ocupar alguno de sus sitios de unión (y, por ejemplo, prevenir o interferir así la unión de otros factores de transcripción al mismo sitio de unión o a sitios próximos) estas versiones severamente truncadas de PacC pueden compensar ciertos aspectos fenotípicos resultantes de la mutación $\Delta pacC$.

2.4 El extremo carboxilo terminal de PacC modula negativamente su localización nuclear.

El estudio de la distribución nucleo-citoplásmica de PacC en distintas estirpes de *A.nidulans* (sección 2.1 de resultados) ha puesto de manifiesto que la señal de pH ambiental alcalino, al promover el procesamiento de PacC (*i.e.* la eliminación de aproximadamente el 60% de los residuos carboxilo terminales de la proteína) regula positivamente su localización nuclear. En una estirpe $pacC^c14$, el producto primario de traducción de este alelo, que carece de los residuos 493-678 de PacC, se procesa constitutivamente (*i.e.* independientemente del pH ambiental) y la pequeña proporción que no se procesa se localiza preferentemente en el núcleo. Estos resultados sugieren que la interacción del extremo carboxilo terminal de PacC (al menos de la región comprendida entre los residuos 493 y 678) con otros residuos de la proteína previene la localización nuclear de PacC. Con objeto de intentar reconstruir esta interacción en un fondo $pacC^c14$ y analizar sus efectos sobre la localización subcelular de PacC, se ha estudiado si la expresión de PacC(305-678) (la mitad carboxilo terminal de la proteína) podía prevenir la localización nuclear del producto primario de traducción de $pacC^c14$

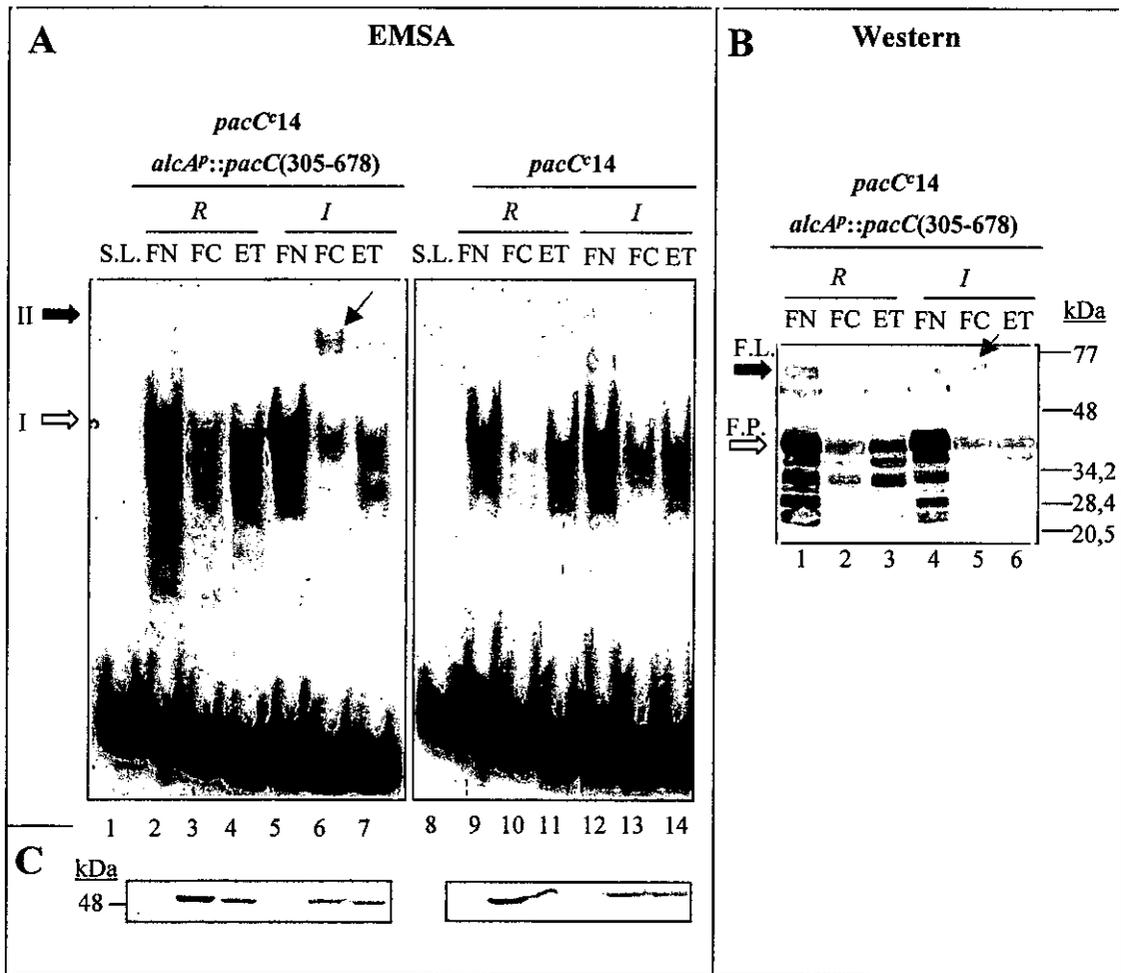


Figura 51. La expresión de la mitad carboxilo terminal de PacC previene la localización subcelular del producto primario de traducción de *pacC^{c14}*. (A) Análisis por EMSA de PacC con los extractos indicados de las estirpes *pacC^{c14}* y *alcA^P::pacC(305-678)*; *pacC^{c14}*. Las estirpes se cultivaron durante 14 horas a 37°C en MFA ácido en condiciones represoras para *alcA^P* y el micelio resultante se transfirió a MFA ácido fresco y se cultivó durante 6 horas más en condiciones de inducción. Se obtuvieron los extractos de las fracciones nuclear (FN) y citoplásmica (FC) tras el fraccionamiento subcelular de muestras de micelio recogidas de los cultivos en condiciones de represión (R) y de inducción (I). Asimismo, se obtuvieron extractos sin fraccionar (ET). Las flecha de bloque blanca indica el complejo proteína-DNA formado por la forma procesada de PacC (I). La flecha de bloque negra y la flecha azul indican el complejo (II) formado por los productos primario de traducción de *pacC* y *pacC^{c14}*, respectivamente. S.L., sonda libre. (B) Análisis por *western*, utilizando un anticuerpo contra el dominio de unión a DNA de PacC, de los mismos extractos de la estirpe *alcA^P::pacC(305-678)*; *pacC^{c14}* analizados por EMSA. Las flecha de bloque blanca indica la forma procesada de PacC (F.P.). La flecha de bloque negra y la flecha azul indican el producto primario de traducción de *pacC^{c14}* (F.L.). (C) Análisis por *western* de la proteína hexoquinasa en los mismos extractos analizados por EMSA en (A).

y/o de la forma procesada de PacC. Para ello se analizó la distribución nucleo-citoplásmica de PacC en una estirpe merodiploide *alcA^P::pacC(305-678)*; *pacC^{c14}* cultivada tanto en condiciones de represión como de inducción, en comparación con una estirpe *pacC^{c14}*

cultivada en las mismas condiciones. El análisis por EMSA de PacC en extractos proteicos (Fig. 51A) mostró cómo si bien en condiciones de represión los niveles de los complejos I y II con las fracciones citoplásmica y nuclear de ambas estirpes fueron muy similares, en condiciones de inducción, aumentaron notablemente los niveles de complejo II con la fracción citoplásmica de la estirpe merodiploide. Así estos niveles pasaron de ser prácticamente indetectables (condiciones de cultivo represoras) a ser claramente superiores a los detectados con la fracción nuclear.

Los resultados del análisis por *western* de PacC en los extractos de la estirpe merodiploide (Fig. 51B) coincidieron con los obtenidos por EMSA, lo que indica que el aumento de los niveles del complejo formado por el producto primario de traducción en la fracción citoplásmica en condiciones de inducción se correspondían con un aumento de los niveles de proteína y no eran debidos, por ejemplo, a un aumento de la afinidad de esta proteína por el DNA resultante de la coexpresión de PacC(305-678). Estos resultados muestran que la expresión de PacC(305-678) previene, al menos parcialmente, la localización nuclear del producto primario de traducción (truncado) codificado por el alelo *pacC*^{c14} sin modificar la localización nuclear de la forma procesada de PacC, favoreciendo la hipótesis de que el extremo carboxilo terminal de PacC puede interaccionar con otras regiones de la proteína y que esta interacción puede estar implicada en la modulación negativa de la localización nuclear del producto primario de traducción de *pacC* en ausencia de la señal de pH alcalino.

RESULTADOS

PARTE III

AUTORREGULACIÓN DE *pacC*.

3. Autorregulación de *pacC*.

3.1 La forma procesada de PacC no es suficiente para activar la expresión de *pacC*.

Tilburn *et al.* (1995) demostraron que en una estirpe *pacC*⁺ la transcripción de *pacC* aumenta al aumentar el pH del medio de cultivo y que en condiciones de cultivo neutras los niveles de transcrito de *pacC* son más altos en una estirpe *pacC*^c11 y más bajos en una estirpe *palF15* que en una estirpe *pacC*⁺. Este patrón de transcripción, correspondiente al de un gen "alcalino", y el hecho de que existan tres sitios consenso de unión a PacC en el promotor de *pacC* sugerían que *pacC* podría regular positivamente su propia expresión.

El modelo de Orejas *et al.* (1995) propone que la forma activa de PacC capaz de prevenir la transcripción de genes "ácidos" y activar la transcripción de genes "alcalinos" es la forma procesada de la proteína. Esta autorregulación positiva implica que la forma procesada de PacC debe activar la expresión de su propio gen, por lo que debería esperarse que la expresión simultánea en estirpes diploides de un alelo *pacC*^c (alelos de ganancia de función que codifican versiones de PacC que se procesan de manera independiente de pH) y un alelo *pacC*⁺ resultara en niveles de PacC más elevados que los resultantes de expresar simultáneamente dos alelos *pacC*⁺ o un alelo *pacC*⁺ y un alelo *pacC*^{+/}.

La figura 52 muestra el análisis por EMSA de PacC en extractos de tres estirpes diploides, una de ellas homocigótica (*pacC*^{+/pacC}⁺) y dos de ellas heterocigóticas (*pacC*^{+/pacC}^c14 y *pacC*^{+/pacC}^{+/}7604) correspondientes a condiciones de cultivo ácidas y alcalinas, en comparación, como controles, con estirpes haploides *pacC*⁺ y Δ *pacC* (esta última solamente en condiciones de cultivo ácidas). En todos los extractos (excepto en el de la estirpe Δ *pacC*) se detectaron dos complejos de retardamiento correspondientes a la forma sin procesar (complejo II) y a la forma procesada (complejo I) de PacC, observándose un tercer complejo de mayor movilidad electroforética (complejo III) correspondiente a la proteína codificada por *pacC*^{+/}7604 en los extractos del diploide *pacC*^{+/pacC}^{+/}7604 (carriles 6 y 7). Asimismo puede observarse cómo, en iguales condiciones de cultivo (pH ácido o alcalino), los niveles del complejo II en los extractos de las tres estirpes diploides fueron muy semejantes entre sí, a pesar de que los niveles de forma procesada en condiciones ácidas fueron mucho mayores en el heterocigoto *pacC*^{+/pacC}^c14 (carril. 4) que en los otros dos diploides, como resultado de la expresión del alelo *pacC*^c. Por otro lado los niveles del complejo III que aparecen en el extracto de la estirpe *pacC*^{+/pacC}^{+/}7604 fueron muy similares en las dos condiciones de cultivo (carriles 6 y 7), a pesar de que en condiciones de cultivo alcalinas los niveles del complejo I (formado por la forma procesada de PacC) son mucho mayores que en condiciones de cultivo ácidas. Estos resultados no son compatibles en principio con la hipótesis de una autorregulación positiva de *pacC*.

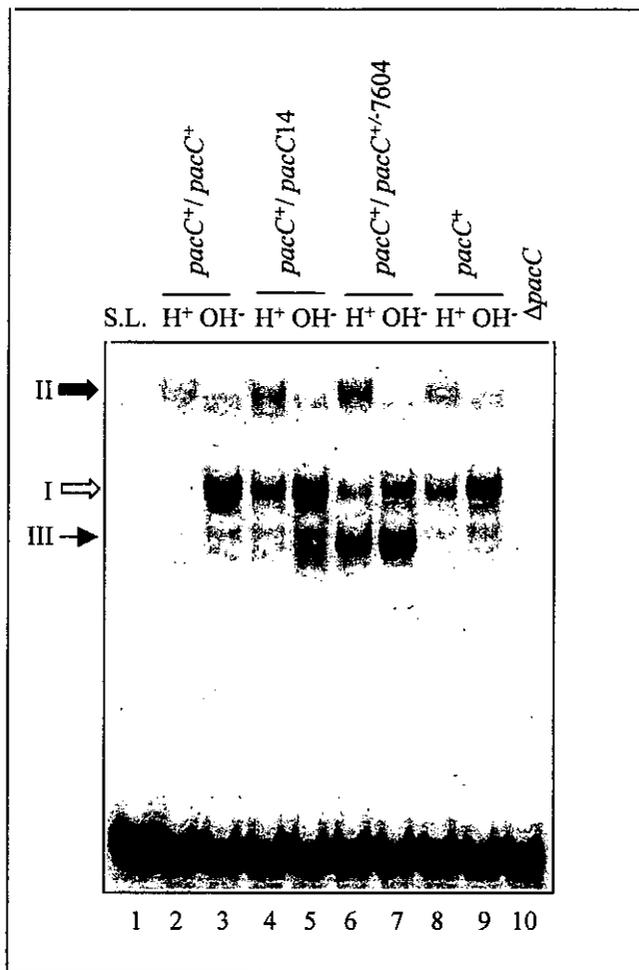


Figura 52. Análisis por EMSA de PacC en estirpes diploides. Se analizaron extractos proteicos de las estirpes diploides indicadas obtenidos tras cultivar los micelios durante 24 horas en MFA tamponado a pH ácido (H⁺) o alcalino (OH⁻) suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Como control se muestran los complejos que se formaron con los extractos de una estirpe silvestre (*pacC⁺*) obtenidos en las mismas condiciones de cultivo y con un extracto de una estirpe $\Delta pacC$ obtenido de micelio cultivado en condiciones ácidas (nótese que la mutación $\Delta pacC$ previene el crecimiento a pH alcalino). Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos formados por la forma procesada de PacC (I) y el producto primario de traducción de *pacC⁺* (y *pacC^{C14}*) (II), respectivamente. La flecha negra indica el complejo formado por el producto génico de *pacC^{+/7604}* (III). S.L., sonda libre.

Con el fin de estudiar directamente los efectos de la forma procesada de PacC sobre la expresión del gen, decidimos comparar los niveles de mRNA de *pacC* y su producto proteico en función de la expresión del alelo *alcA^P::pacC(5-265)*, que codifica una versión de PacC muy similar a la forma procesada (ver sección 1.1 de resultados). Para ello, los plásmidos *p[alcA^P::pacC(5-265)]* (Fig. 18B) o, como control negativo, el plásmido pALC (ver sección 2 de materiales y métodos; Fig. 17), se introdujeron en una estirpe mutante *pacC^{+/7604}* por

| Estirpe | Crecimiento | | Fosfatasa alcalinas | | Fosfatasa ácidas | |
|---|-------------|---|---------------------|---|------------------|---|
| | R | I | R | I | R | I |
| <i>pacC^{+/}7604</i> | 5 | 5 | - | - | 8 | 8 |
| pALC; <i>pacC^{+/}7604</i> | 5 | 5 | - | - | 8 | 8 |
| <i>alcA^P::pacC(5-265); pacC^{+/}7604</i> | 5 | 3 | - | 7 | 8 | 1 |
| <i>alcA^P::pacC(5-678); pacC^{+/}7604</i> | 5 | 4 | - | 3 | 8 | 6 |
| <i>pacC⁺</i> | 10 | 8 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>pacC^c14</i> | 10 | 8 | 7 | 8 | 1 | 1 |

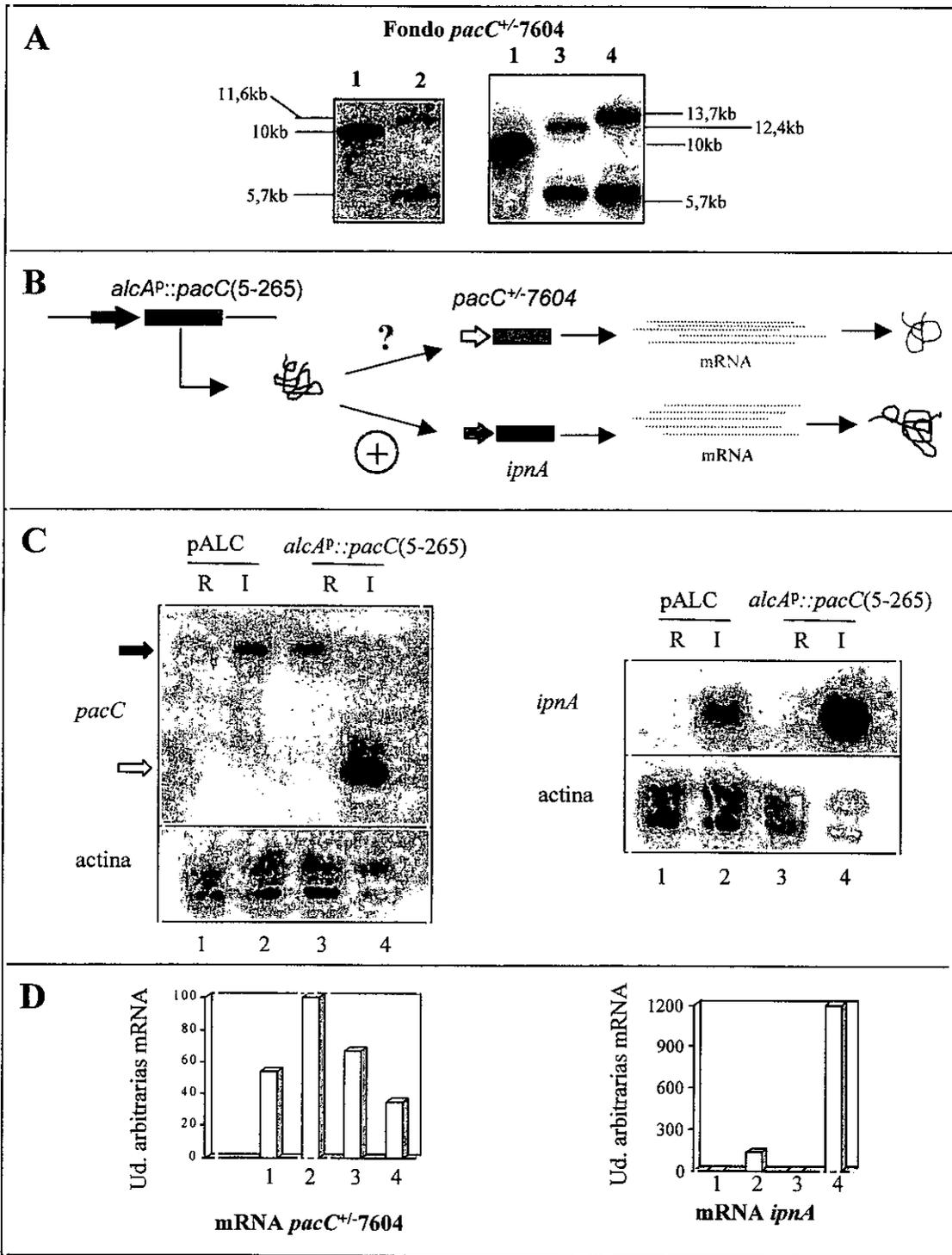
Tabla 4. Análisis fenotípico de una estirpe *pacC^{+/}7604* y de transformantes de esta estirpe con los transgenes *alcA^P::pacC(5-265)* o *alcA^P::pacC(5-678)*. Se muestran los datos de crecimiento (a las 48 horas), actividad fosfatasa alcalina y actividad fosfatasa ácida (ambas actividades a las 24 horas) de las estirpes indicadas cultivadas en medio mínimo tamponado a pH neutro (el gión indica actividad no detectable). Como fuentes de carbono se utilizaron glucosa al 1% (condiciones de represión (R) para *alcA^P*) o etanol al 1% y glucosa al 0,05% (condiciones de inducción (I) para el promotor). Como control, se muestran los datos fenotípicos de una estirpe *pacC^c14* y una estirpe silvestre (*pacC⁺*). Datos proporcionados por la Dra. Joan Tilburn (*Department of Infectious Diseases, Emperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, Londres*).

transformación, seleccionándose por Southern transformantes con una sola copia del plásmido correspondiente integrado en el *locus argB* (Fig. 53A). Al utilizarse una estirpe con la mutación *pacC^{+/}7604* (que da lugar a la proteína truncada PacC(5-173 + QSLDLATQI*)) como estirpe receptora, la única proteína PacC semejante en tamaño a la forma procesada se obtuvo de la expresión de *alcA^P::pacC(5-265)*. Además, ambas proteínas, “residente” y “transgénica”, tenían tamaños claramente distintos.

El análisis fenotípico de los transformantes seleccionados, en distintos medios diagnósticos (Joan Tilburn, comunicación personal; tabla 4), mostró cómo en condiciones represoras (para *alcA^P*) los dos transformantes son indistinguibles de la estirpe receptora. En condiciones de inducción, la estirpe control continúa siendo indistinguible de la estirpe receptora (no se detectó tinción específica de fosfatasa alcalina y se detectaron niveles altos de fosfatasa ácida). Por el contrario, en la estirpe con el transgén *alcA^P::pacC(5-265)* se detectaron niveles altos de fosfatasa alcalina y bajos de fosfatasa ácida. Estos niveles de fosfatasa ácida y alcalina fueron similares a los detectados en una estirpe con una mutación *pacC^c14* (que mimetiza condiciones de cultivo alcalinas). Estos resultados indican que el alelo *pacC(5-265)* codifica una proteína funcional en cuanto a la activación de las fosfatasa alcalinas y la represión de las fosfatasa ácidas se refiere, y que es dominante (en condiciones de inducción) sobre *pacC^{+/}7604*.

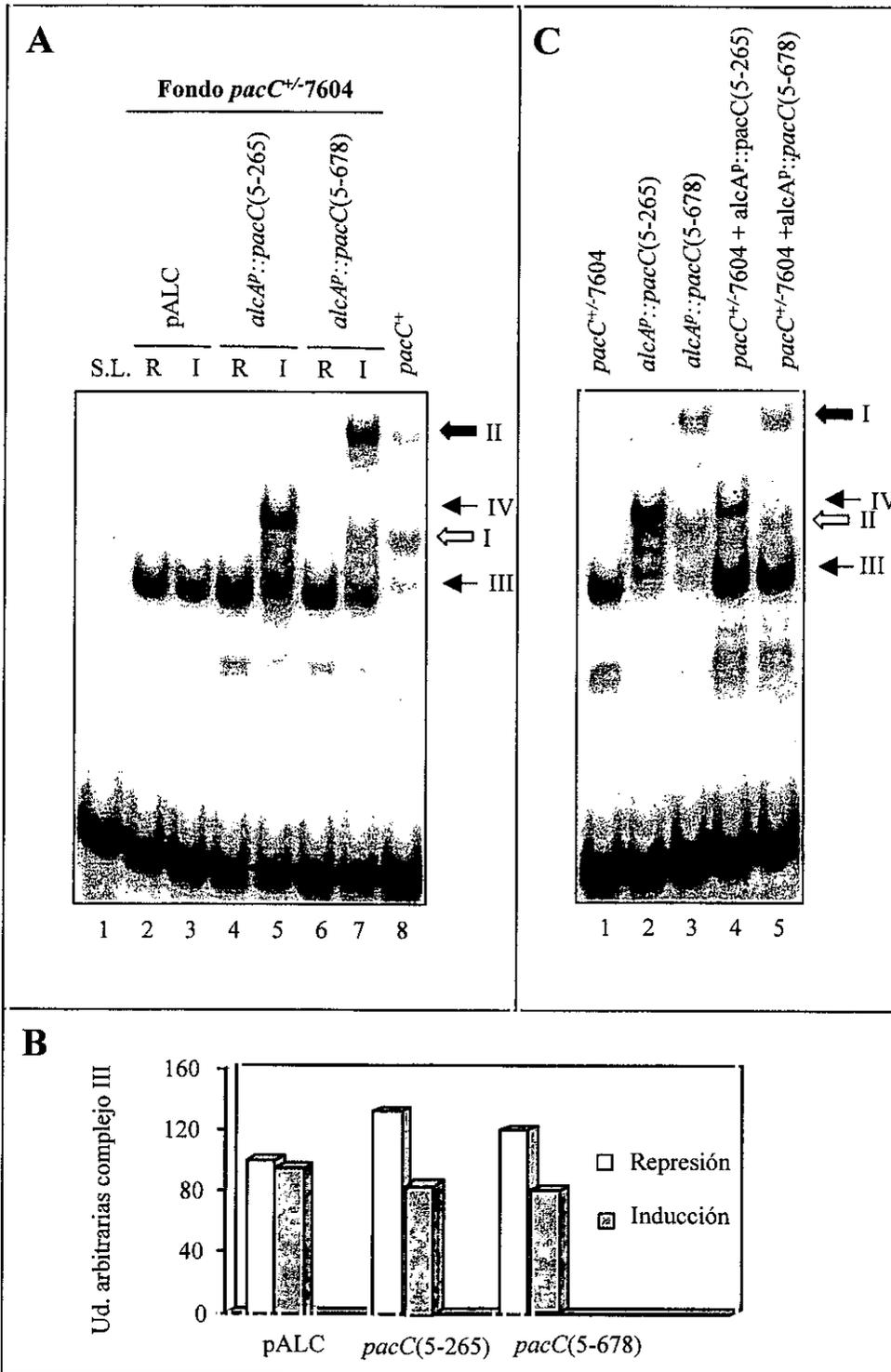
Los transformantes seleccionados se cultivaron en MFA ácido en condiciones de represión para *alcA^P* (glucosa al 3%(p/v)) durante 14 horas y parte del micelio así cultivado se transfirió a medio MFA ácido con glucosa al 0,05% (p/v) y treonina 100 mM (condiciones de inducción para *alcA^P*) cultivándose durante 6 horas más (condiciones idénticas a las usadas en la sección 1.1). Mediante análisis por el método de northern se determinaron los niveles de transcrito de *pacC* a partir de micelio cultivado tanto en condiciones de represión como de inducción. Paralelamente, se determinaron también los niveles de transcrito del gen *ipnA* como prototipo de un gen estructural de expresión predominante a pH ambiental alcalino (Espeso *et al.*, 1993; Espeso, 1994; Espeso y Peñalva, 1996). En la figura 53C (panel derecho) puede apreciarse cómo la inducción del transgén *alcA^P::pacC(5-265)* resultó (al cuantificar los niveles de transcrito mediante Phosphorimager, normalizados a los niveles de los transcritos de actina) en un incremento de ~ cinco veces de los niveles de la transcripción de *ipnA* (compárense los carriles 2 y 4). Por el contrario, los niveles de transcrito de *pacC* no sólo no se incrementaron con la expresión de *pacC(5-265)* sino que incluso parecieron disminuir (Fig. 53C, panel izquierdo (compárense el carril 4 con los carriles 2 y 3)). Estos resultados muestran que la proteína PacC(5-265) es capaz de activar la expresión de un gen estructural de expresión preferente a pH alcalino (*ipnA*), pero aparentemente no activa la expresión de *pacC*. (Nótese que los niveles de transcrito de *ipnA* en la estirpe control son claramente superiores en condiciones de inducción (Figura 53C, panel derecho, carril 2) con respecto a condiciones de represión (Figura 53C, panel derecho, carril 1), niveles prácticamente indetectables. Este hecho se debe al efecto represor que la glucosa al 1% (p/v) (pero no la treonina 100 mM o la propia glucosa al 0,05% (P/v)) ejerce sobre la transcripción de *ipnA* (Espeso *et al.*, 1993; Espeso, 1994; Pérez-Esteban *et al.*, 1993)).

La figura 54A muestra el análisis por EMSA de PacC en extractos proteicos de micelio cultivado tanto en condiciones de represión como de inducción de tres transformantes de la estirpe *pacC⁺7604* con una sola copia de los plásmidos pALC, p[*alcA^P::pacC(5-265)*] y p[*alcA^P::pacC(5-678)*], respectivamente, integrada en el *locus argB* (Fig. 53A). El último transformante se obtuvo con el objeto de poder comparar los posibles efectos de la expresión de PacC(5-265) (es decir una proteína similar a la forma procesada de PacC) con los de la expresión de PacC(5-678) (el producto primario de traducción) sobre los niveles de la proteína PacC truncada codificada por *pacC⁺7604*. Mientras que en condiciones de cultivo represoras para *alcA^P* en las tres estirpes transformantes (Fig. 54A carriles 2,4 y 6) se detectaron niveles muy parecidos de un único complejo de retardamiento (complejo III) correspondiente al producto de *pacC⁺7604*, en condiciones de inducción (Fig. 54A carriles 3,5 y 7), los niveles de complejo III en las estirpes que expresan PacC(5-265) y PacC(5-678) (pero no en la estirpe control) disminuyeron apreciablemente con respecto a los detectados en condiciones represoras. La inducción de *alcA^P::pacC(5-265)* dio lugar a la formación de un nuevo complejo



de retardamiento (complejo IV) correspondiente a la proteína codificada por este alelo y a una disminución de los niveles de complejo III del orden del 40% (fig. 54B), mientras que la inducción de *alcA^P::pacC(5-678)* dio lugar a la formación de los complejos de retardamiento I y II (este último mayoritario) correspondientes a la forma procesada y sin procesar de PacC, respectivamente, y a una disminución similar de los niveles de complejo III (Fig. 54B). La disminución del complejo III podría explicarse, entre otros motivos, por un efecto represor directo o indirecto de las proteínas PacC(5-265) y PacC(5-678) sobre la transcripción de *pacC*^{+/7604} o, alternativamente, porque la afinidad de estas dos proteínas por la sonda empleada en el EMSA (*ipnA2*) fuera mayor que la de la proteína PacC codificada por *pacC*^{+/7604}. Con objeto de comprobar esta última posibilidad se compararon por EMSA los niveles de complejo III detectados con un extracto proteico de una estirpe *pacC*^{+/7604} con los niveles de este complejo obtenidos con una mezcla en cantidades iguales de este extracto con extractos de estirpes *alcA^P::pacC(5-265)* o *alcA^P::pacC(5-678)* cultivadas en condiciones de inducción. En la figura 54C puede apreciarse cómo en los tres casos se detectaron niveles muy parecidos del complejo III (comparar carril 1 con carriles 4 y 5) lo que sugiere que la desaparición del complejo III no es justificable por una diferente afinidad por la sonda de las distintas formas de PacC.

Figura 53. Efecto de la sobreexpresión de PacC(5-265) sobre la transcripción de *pacC* en un fondo *pacC*^{+/7604}. (A) hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *EcoRI*) de transformantes de una estirpe *pacC*^{+/7604} con copias únicas de los plásmidos pALC (carril 2), p[*alcA^P::pacC(5-265)*] (carril 3) y p[*alcA^P::pacC(5-678)*] (carril 4) integrados en *argB*, utilizando una sonda para *argB* (en la figura 18 se muestra un esquema de la integración de los dos últimos plásmidos en este locus). Como control se empleó el DNA de la estirpe receptora (carriles 1). (B) Esquema del experimento. Las flechas de bloque roja, amarilla y azul representan los promotores de los genes, *alcA*, *pacC* e *ipnA*, respectivamente. En verde y en violeta se indican los genes (rectángulos) *pacC* e *ipnA*, respectivamente, así como sus correspondientes mRNAs (línea punteada) y productos génicos (C) Niveles de transcrito de *pacC* (panel izquierdo) e *ipnA* (panel derecho) en los transformantes con la construcción *alcA^P::pacC(5-265)* o el plásmido pALC (control negativo). Los transformantes se cultivaron en MFA ácido 14 horas a 37°C en condiciones de represión para *alcA^P*. El micelio resultante se transfirió a MFA ácido fresco y se cultivó durante 6 horas más en condiciones de inducción. Se aisló el RNA de muestras de micelio recogidas tras los cultivos en condiciones de represión (R) e (I) inducción. Los niveles de transcrito de *pacC* e *ipnA* se analizaron por el método de northern. Las membranas se rehibridaron con la sonda del transcrito de actina como control de la equivalencia de cargas de RNA en los distintos carriles. Las flechas de bloque negra y blanca indican los transcritos de *pacC*^{+/7604} y *pacC(5-265)*, respectivamente. (D) Cuantificación de los niveles de mRNA de *pacC* e *ipnA* normalizados a los niveles de los transcritos de las actinas. Los valores se refirieron arbitrariamente a los del transcrito de *pacC* e *ipnA* en el transformante con el plásmido pALC tras el cultivo en condiciones de inducción, que se consideraron 100%.



En exposiciones menores del EMSA mostrado en la figura 54A (resultados no mostrados) pudo apreciarse cómo con los extractos de los merodiploides *alcA^P::pacC(5-265)*; *pacC⁺-7604* y *alcA^P::pacC(5-678)*; *pacC⁺-7604* obtenidos en condiciones de inducción para *alcA^P* (carriles 5 y 7) la disminución de los niveles del complejo III con respecto a las condiciones de represión fue acompañada de una disminución de la cantidad de sonda libre no justificada por la aparición de los nuevos complejos. Esta desaparición simultánea del complejo III y de la sonda libre sería explicable si la coexpresión tanto de PacC(5-265) como de PacC(5-678) con el producto de *pacC⁺-7604* promoviera la formación de un complejo proteico capaz de unirse al DNA, pero con un tamaño lo suficientemente grande como para ser excluido del gel de poliacrilamida. En cualquier caso, los resultados arriba expuestos no sólo no favorecen la hipótesis de una autorregulación positiva de la transcripción de *pacC*, sino que, además, plantean nuevos interrogantes relacionados con posibles interacciones entre las distintas formas de la proteína.

Al igual que ocurre en un fondo genético *pacC⁺-7604*, en un fondo genético *paIA1* la proteína PacC(5-265) no parece activar la expresión de *pacC*. La mutación *paIA1* es una mutación de pérdida de función en el gen *paIA* que, al igual que las mutaciones de pérdida de función en los restantes genes *paI*, mimetiza condiciones de cultivo ácidas (Caddick *et al.*, 1986a; Sha *et al.* 1991; Arst *et al.* 1994). En una estirpe *paIA1*, la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino está bloqueada, de forma que PacC no puede activarse y la mayor parte de la proteína se encuentra como producto primario de traducción (Orejas *et al.*, 1995; sección 1.1 de resultados). El análisis fenotípico en medios diagnósticos (Tabla 5) de una

Figura 54. Efecto de la sobreexpresión de PacC(5-265) o PacC(5-678) sobre los niveles del producto génico de *pacC⁺-7604*. (A) Análisis por EMSA de PacC en extractos proteicos de transformantes de la estirpe *pacC⁺-7604* con los transgenes *alcA^P::pacC(5-265)*, *alcA^P::pacC(5-678)* o con el plásmido pALC (estirpe control). Las estirpes se cultivaron 14 horas a 37°C en MFA ácido en condiciones represoras y el micelio resultante se transfirió a MFA ácido fresco y se cultivó durante 6 horas más en condiciones de inducción. Se obtuvieron extractos de muestras de micelio recogidas tras el crecimiento en condiciones de represión (R) e inducción (I). Como control se muestran los complejos PacC-DNA que se formaron con un extracto de una estirpe silvestre (*pacC⁺*) cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos DNA-proteína formados por la forma procesada (I) y el producto primario de traducción PacC (II), respectivamente. Las flechas negras indican los complejos formados por los productos génicos de *pacC⁺-7604* (III) o *pacC(5-265)* (IV). (B) Cuantificación de los niveles de complejo III detectados en el panel A. En cada caso los niveles de radiactividad de este complejo se normalizaron a la radiactividad total medida en el carril correspondiente. Los valores están referidos a los niveles detectados en la estirpe control tras el cultivo en condiciones de represión al que se le asignó el valor 100%. (C) Análisis por EMSA de PacC en extractos de una estirpe *pacC⁺-7604* (carril 1) y de transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ con los transgenes *alcA^P::pacC(5-265)* (carril 2) o *alcA^P::pacC(5-678)* (carril 3). Se analizaron 5 μ g de los extractos por separado (carriles 1, 2 y 3) o bien mezclas de cantidades iguales (5 μ g de cada uno) de los extractos 1 y 2 (carril 4) ó 1 y 3. (carril 5). Los extractos se mezclaron justo antes de la incubación con el DNA. La estirpe *pacC⁺-7604* se cultivó 20 h a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono y los transformantes de la estirpe $\Delta pacC$ se cultivaron 14 horas en MFA ácido, en condiciones de represión y 6 horas más en condiciones de inducción para *alcA^P*.

| Estirpe | Crecimiento | | Fosfatasas alcalinas | | Fosfatasas ácidas | |
|---|-------------|---|----------------------|---|-------------------|---|
| | R | I | R | I | R | I |
| <i>palA1</i> | 8 | 8 | - | - | 8 | 8 |
| <i>alcA^P::pacC(305-678); palA1</i> | 5 | 4 | - | - | 8 | 8 |
| <i>alcA^P::pacC(5-265); palA1</i> | 5 | 3 | - | 6 | 8 | 1 |
| <i>pacC[*]</i> | 10 | 8 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>pacC^c14</i> | 10 | 8 | 7 | 8 | 1 | 1 |

Tabla 5. Análisis fenotípico en medio sólido de una estirpe *palA1* y de transformantes de esta estirpe con los transgenes *alcA^P::pacC(5-265)* o *alcA^P::pacC(305-678)*. Se muestran los datos de crecimiento (a las 48 horas), actividad fosfatasa alcalina y actividad fosfatasa ácida (ambas actividades medidas a las 24 h) de las estirpes indicadas cultivadas en medio mínimo tamponado a pH neutro (el guión indica actividad no detectable). Como fuentes de carbono se utilizaron glucosa al 1% (condiciones de represión (R) para *alcA^P*) o etanol al 1% y glucosa al 0.05% (condiciones de inducción (I) para el promotor). Como control, se muestran los datos fenotípicos de una estirpe *pacC^c14* y una estirpe silvestre (*pacC^{*}*). Datos proporcionados por la Dra. Joan Tilburn (*Department of Infectious Diseases, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, Londres*).

estirpe *palA1* y de sendos transformantes de esta estirpe con una única copia (en *argB*), bien de la construcción *alcA^P::pacC(5-265)* o de la construcción *alcA^P::pacC(305-678)* (control negativo), mostró cómo en condiciones de represión para *alcA^P* el fenotipo de estos transformantes es indistinguible del de la estirpe receptora *palA1* (niveles indetectables de actividad fosfatasa alcalina y muy elevados de actividad fosfatasa ácida), mientras que en condiciones de inducción, si bien la expresión de *PacC(305-678)* no modifica el fenotipo de la estirpe receptora, la expresión de *PacC(5-265)* da lugar a un fenotipo de mimesis de alcalinidad (niveles altos de actividad de fosfatasa alcalina y muy bajos de actividad fosfatasa ácida) prácticamente indistinguible del de una estirpe *pacC^c14*. Estos datos muestran, de nuevo, que el alelo *alcA^P::pacC(5-265)* (en condiciones de inducción) es un alelo de ganancia de función, epistático sobre la mutación *palA1*.

Con objeto de analizar los efectos de la expresión de *PacC(5-265)* sobre los niveles de la proteína *PacC* "residente" se llevo a cabo un experimento de expresión transitoria de igual forma a la ya descrita varias veces en esta tesis. Así, la estirpe *palA1* receptora y los dos transformantes mencionados, se cultivaron (en MFA ácido) durante 14 horas en condiciones de represión para *alcA^P* y posteriormente durante 6 horas más en condiciones de inducción para este promotor. El análisis por EMSA de *PacC* en extractos proteicos (Fig. 55B) mostró cómo antes de la inducción se detectaron en las tres estirpes (carriles 2, 4 y 6) altos niveles de

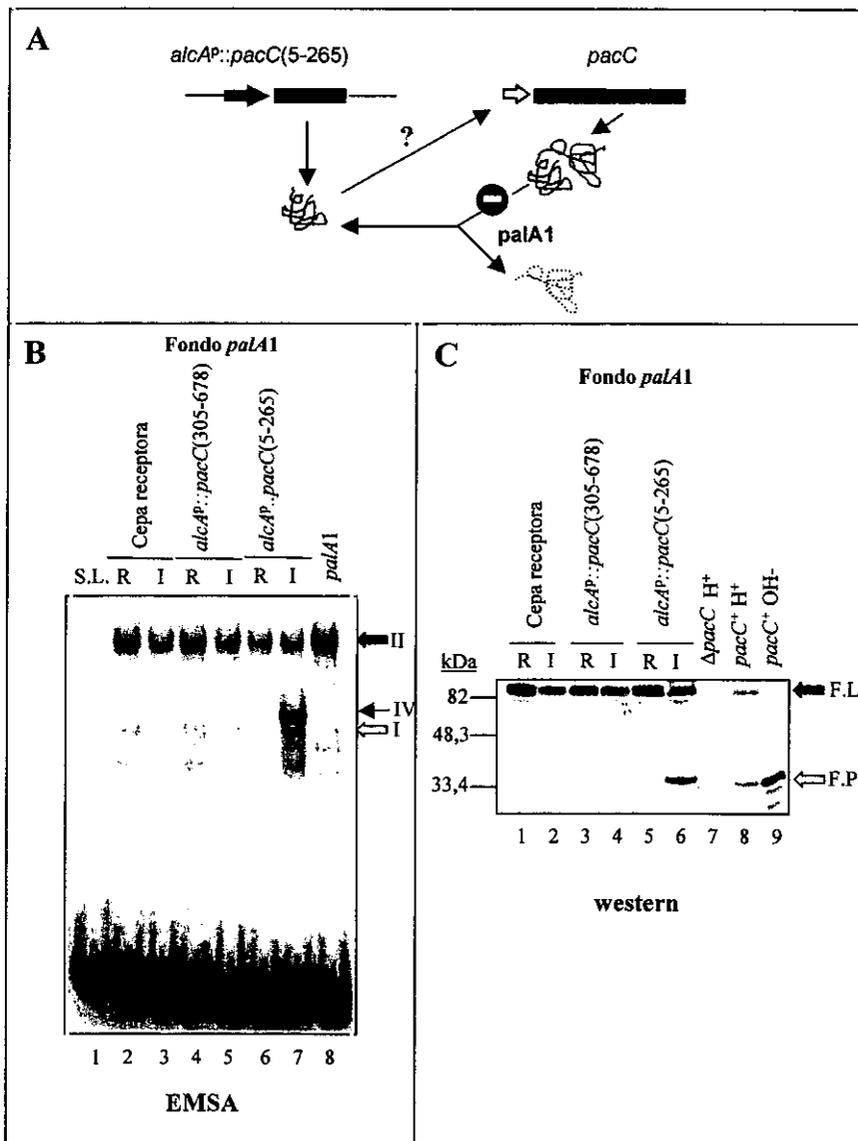


Figura 55. Efecto de la expresión de PacC(5-265) sobre los niveles del producto primario de traducción de PacC en un fondo *palA1*. (A) Esquema del experimento. Las flechas de bloque verde y amarillas representan los promotores de los genes *alcA* y *pacC*, respectivamente y los rectángulos verde y rosa las secuencias codificantes de PacC(5-265) y PacC(266-678), respectivamente. La acción positiva de PacC(5-265) sobre la expresión de *pacC* (rectángulo verde y rosa) daría lugar a un incremento en los niveles del producto primario de traducción, ya que en un fondo *palA1* el procesamiento de PacC está bloqueado. (B) Análisis por EMSA de PacC en extractos de una estirpe *palA1* (estirpe receptora) y de transformantes de esta estirpe con los transgenes *alcA^P::pacC(305-678)* (control negativo) o *alcA^P::pacC(5-265)*. Las estirpes se cultivaron 14 horas a 37°C en MFA ácido en condiciones represoras para *alcA^P* y el micelio resultante se transfirió MFA ácido fresco y se cultivó durante 6 horas más en condiciones de inducción. Los extractos analizados se obtuvieron de muestras de micelio recogidas tras el crecimiento en condiciones de represión (R) e inducción (I). Como control se muestran los complejos que se formaron con un extracto de una estirpe *palA1* cultivada 24 horas a 37°C en MFA ácido suplementado con sacarosa al 3% (p/v) como principal fuente de carbono. Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos DNA-proteína formados por la forma procesada de PacC (I) y por el producto primario de traducción de *pacC* (II), respectivamente. La flecha negra indica el complejo formado por la proteína PacC(5-265) (IV). (C) Análisis por western de los mismos extractos analizados por EMSA. Se utilizó un anticuerpo contra el dominio de unión a DNA de PacC. Como controles, se analizaron extractos de una estirpe *pacC⁺* o una estirpe $\Delta pacC$ obtenidos de micelios cultivados durante 20 horas a 37°C en MFA con sacarosa al 3% (p/v) y tamponado a pH ácido (H⁺) o alcalino (OH⁻), según se indica. F.L., producto primario de traducción de PacC. F.P. forma procesada de PacC.

producto primario de traducción (complejo II) y niveles apenas detectables de la proteína procesada (complejo I). Tras la inducción los niveles de estas dos formas de la proteína no variaron en ninguna de las tres estirpes (carriles 3, 5 y 7) pero aparecieron altos niveles de PacC(5-265) (complejo IV) en la estirpe transformada con *alcAp::pacC(5-265)*. Los resultados del análisis por *western* (Fig. 55C) de estos mismos extractos fueron muy similares a los obtenidos por EMSA. Estos resultados muestran que, al igual que en un fondo genético *pacC⁺* 7604, la expresión de PacC(5-265) en un fondo genético *palA1*, si bien resulta en mimesis de alcalinidad, no da lugar a un incremento detectable de los niveles de producto primario de traducción de *pacC* (cuyo procesamiento está bloqueado por la mutación *palA1*). Estos resultados de nuevo están en contra de una autorregulación positiva de la expresión de *pacC*.

3.2 La forma sin procesar de PacC parece modular negativamente la función *pacC*.

Con objeto de estudiar si el producto primario de traducción de *pacC* desempeña alguna función, se han estudiado los efectos a nivel fenotípico de la sobreexpresión de PacC(5-678) en estirpes *pacC⁺* y *pacC^c14*, tanto en un fondo genético *palA⁺* como en un fondo *palA1*, en comparación con los efectos de la sobreexpresión de PacC(5-265). Con este fin se obtuvieron transformantes en los fondos genéticos mencionados con una única copia del transgén *alcA^P::pacC(5-678)* o del transgén *alcA^P::pacC(5-265)* integrada en *argB*. Como control, se usaron estirpes con estos transgenes en un fondo genético $\Delta pacC$ (sección 1.1 de resultados).

El análisis fenotípico de las estirpes merodiploides (fondos *pacC⁺* y *pacC^c14*) en medios diagnósticos mostró cómo en un fondo *palA⁺* la expresión de PacC(5-678) (Fig. 56A) resulta en una pérdida parcial de función *pacC*. Así, mientras que en condiciones de represión el fenotipo de los merodiploides es prácticamente indistinguible del de las estirpes receptoras (*pacC⁺* o *pacC^c14*), la expresión de PacC(5-678) (inducción) resultó en una ligera pérdida de función *pacC* en un fondo genético *pacC⁺* (disminuyó la actividad fosfatasa alcalina) y en una clara atenuación del fenotipo de ganancia de función en un fondo *pacC^c14* (aumentaron y disminuyeron las actividades fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente). En este último caso, los niveles de actividad fosfatasa ácida llegaron a ser similares a los de una estirpe *pacC⁺* y los niveles de actividad fosfatasa alcalina ligeramente menores, por lo que el fenotipo resultante es muy similar al silvestre. En un fondo *palA1*, la expresión de PacC(5-678) en las estirpes *pacC⁺* (datos no mostrados) y *pacC^c14* (la mutación *pacC^c14* es epistática sobre la mutación *palA1*) (Fig. 56B) resultó en un fenotipo indistinguible del de una estirpe *palA1* (en cuanto a sensibilidad al pH alcalino, neomicina y actividad de fosfatasa ácida). Estos resultados indican que el alelo *pacC(5-678)* (en condiciones de inducción) es un dominante negativo del alelo

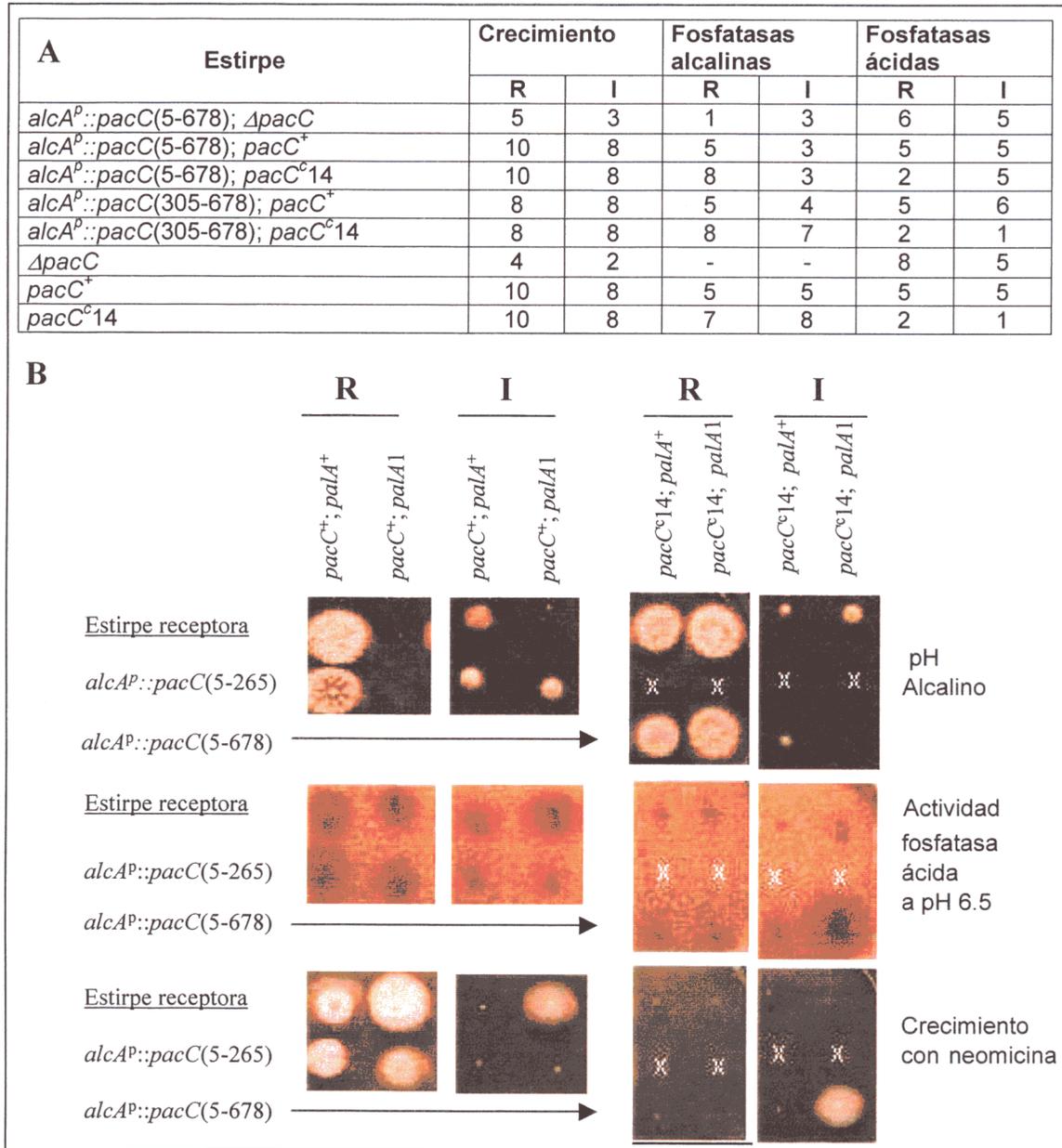


Figura 56. Análisis fenotípico en medio sólido de estirpes merodiploides para *pacC*. (A) Datos de crecimiento, actividad fosfatasa ácida y actividad fosfatasa alcalina de las estirpes indicadas (el guión indica actividad no detectable). (B) Sensibilidad al pH ambiental alcalino, actividad fosfatasa ácida y sensibilidad a neomicina de las estirpes receptoras que se indican y de transformantes de estas estirpes con los transgenes indicados (Las cruces blancas indican puntos en los que no se inoculó ninguna estirpe). Como controles, se muestran en (A) los fenotipos de una estirpe *ΔpacC*, una estirpe *pacC^C14* y una estirpe silvestre (*pacC⁺*). Las estirpes se cultivaron 48 horas (24 horas para medir la actividad de las fosfatasas) en medio mínimo tamponado a pH neutro. Como fuentes de carbono se usaron glucosa al 1% (condiciones de represión (R) para *alcA^P*) o etanol al 1% y glucosa al 0.05% (p/v) (condiciones de inducción (I) para el promotor). Datos proporcionados por la Dra. Joan Tilburn (*Department of Infectious Diseases, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, Londres*).

pacC^{c14}, lo que sugiere que el producto primario de traducción de *pacC* no es inactivo y modula negativamente la función *pacC*.

En una estirpe *pacC*⁺, tanto en el fondo genético *paIA*⁺ como en el fondo *paIA1*, en condiciones de inducción, la expresión de PacC(5-265) (versión de PacC semejante en tamaño a la forma procesada) dio lugar a un fenotipo *pacC*^c (Fig. 56A y B), lo que indica que el alelo *pacC*(5-265) (en condiciones de inducción) es dominante sobre el alelo silvestre y, de acuerdo con resultados ya mostrados en varias secciones de esta tesis, es epistático sobre la mutación *paIA1*. En condiciones de represión los merodiploides fueron indistinguibles de las estirpes receptoras de transformación.

Con objeto de estudiar a nivel molecular los posibles efectos sobre PacC de la sobreexpresión de PacC(5-678) en comparación con la sobreexpresión de PacC(305-678) (mitad carboxilo terminal de la proteína) o de una nueva versión de PacC, PacC(5-234::265-678) (PacC Δ 1), que se procesa constitutivamente (*i. e.* independientemente de pH), se obtuvieron transformantes en los dos fondos genéticos mencionados con copias únicas de los transgenes *alcA*^P::*pacC*(305-678) o *alcA*^P::*pacC*(5-234::265-678) integradas en *argB*. Asimismo, se obtuvo un transformante de la estirpe Δ *pacC* con una copia del último transgén mencionado integrada en el mismo locus (Fig. 57C). Los merodiploides, así como las estirpes parentales, y los transformantes de la estirpe Δ *pacC* con los transgenes *alcA*^P::*pacC*(5-678) o *alcA*^P::*pacC*(5-234::265-678) se cultivaron 14 horas (en MFA ácido) en condiciones represoras y 6 horas adicionales en condiciones de inducción. La figura 57A muestra el análisis por EMSA (en condiciones de alta resolución) de PacC en extractos proteicos obtenidos tras el cultivo en condiciones de inducción. Tanto en la estirpe *pacC*⁺ como en la estirpe *pacC*^{c14} (carriles 9 y 10) se detectaron los dos complejos de retardamiento correspondientes a la forma procesada de PacC (complejo I) y al producto primario de traducción (complejo II) (truncado en el caso de la estirpe *pacC*^{c14}). En la estirpe *pacC*^{c14} (condiciones de inducción) el complejo I fue mayoritario (prácticamente no se detectó el complejo II) y en la estirpe *pacC*⁺ los niveles de este complejo fueron aproximadamente el doble que los niveles de complejo II. La expresión de PacC(5-678) tanto en un fondo genético Δ *pacC* como en un fondo *pacC*⁺ dio lugar a un perfil electroforético "especular" al observado en una estirpe *pacC*⁺, de forma que en ambos casos aumentaron los niveles del complejo II, disminuyeron los del complejo I y, en consecuencia, disminuyó la relación entre la forma procesada de PacC y el producto primario de traducción con respecto a la estirpe *pacC*⁺ (lo que podría explicar porqué en los dos casos el fenotipo resultante es de pérdida de función parcial con respecto al fenotipo de una estirpe *pacC*⁺ (Fig. 56A), *vide infra*). En un fondo *pacC*^{c14} la expresión de PacC(5-678) (carril 6) causó un incremento del complejo II y una disminución muy notable del complejo I, con lo que la relación entre la forma procesada de PacC y los productos primarios de traducción (codificados por los

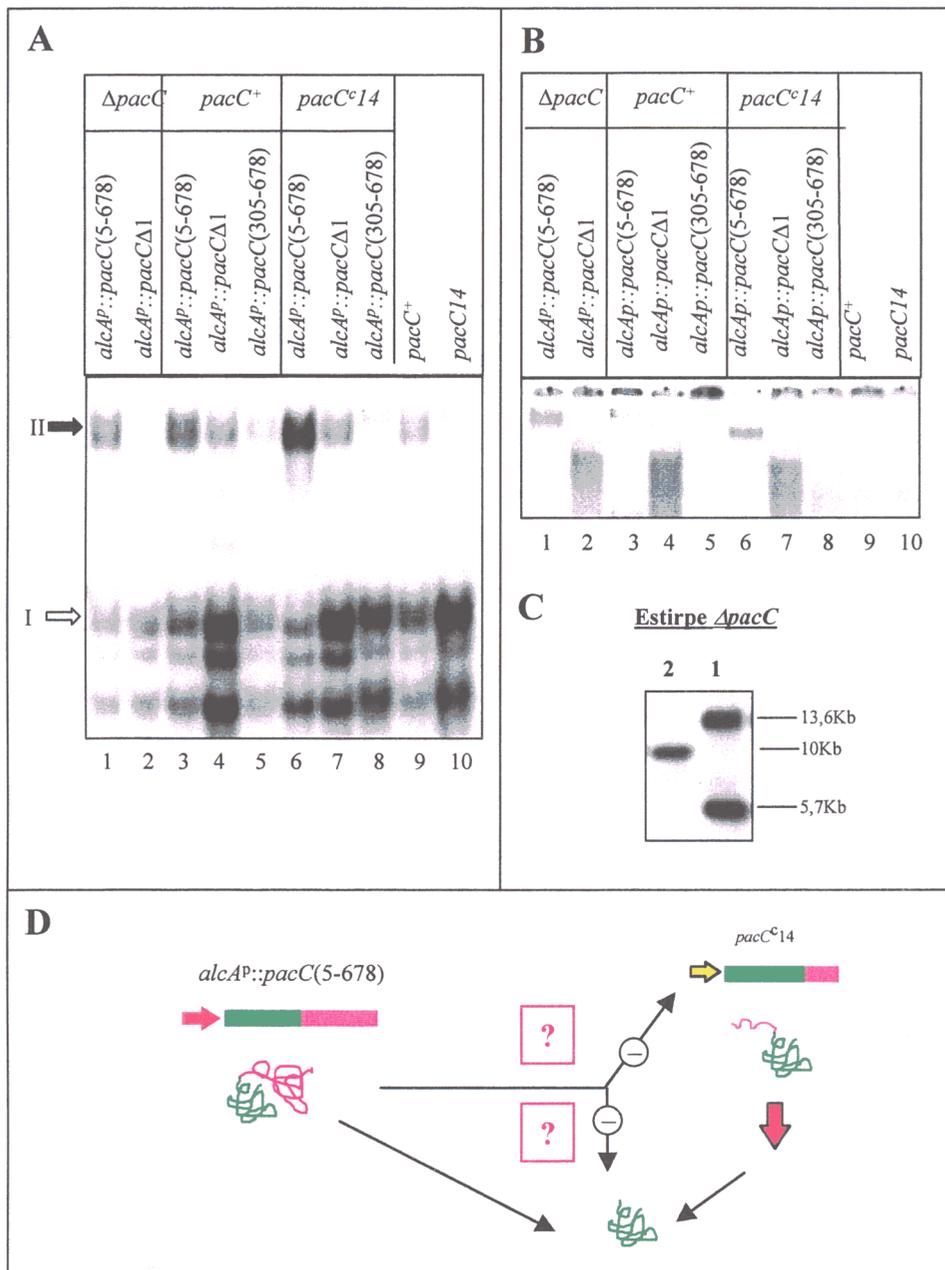


Figura 57. Sobreexpresión de PacC(5-678) en los fondos genéticos $pacC^+$ y $pacC^{c14}$. (A) Análisis por EMSA de PacC en extractos de transformantes de las estirpes $\Delta pacC$, $pacC^+$ y $pacC^{c14}$ con los transgenes que se indican ($pacC\Delta 1::pacC(5-234::265-678)$). Las estirpes se cultivaron 14 horas a 37°C en MFA ácido, en condiciones represoras para $alcA^P$ y el micelio resultante se transfirió a un nuevo MFA ácido cultivándose durante 6 horas más en condiciones de inducción. Los extractos analizados se obtuvieron de muestras de micelio recogidas tras el crecimiento en condiciones de represión (R) e inducción (I). Las flechas de bloque blanca y negra indican los complejos DNA-proteína formados por la forma procesada de PacC (I) y por el producto primario de traducción de $pacC$ o $pacC^{c14}$ (este último truncado) (II), respectivamente. (B) Sobreexposición de la parte superior del EMSA mostrado en el panel A. (C) Hibridación por el método de Southern del DNA (digerido con *EcoRI*) de un transformante de la estirpe $\Delta pacC$ con una copia única del transgén $alcA^P::pacC(5-234::265-678)$ (carril 2) integrada en *argB*, utilizando una sonda para *argB*. Como control se empleó el DNA de la estirpe receptora (carril 1). (D) Dos posibles mecanismos hipotéticos por los que PacC(5-678) podría modular negativamente la función $pacC$ en un fondo $pacC^{c14}$: represión directa de la transcripción (parte superior derecha) o formación de heterodímeros con la forma procesada de PacC que podrían prevenir la función de esta forma de la proteína (parte inferior).

alelos *pacC*⁺ y *pacC*^{c14}) disminuyó. Como control, la expresión de PacC(305-678) (mitad carboxilo terminal de la proteína) en los fondos genéticos *pacC*⁺ y *pacC*^{c14} no resultó en ningún efecto significativo ni a nivel fenotípico (Fig. 56A) ni a nivel molecular (en comparación con las estirpes receptoras). Estos resultados muestran, que en los fondos genéticos *pacC*⁺ y *pacC*^{c14}, el fenotipo resultante (perdida parcial de función *pacC*, *vide supra*) de la expresión en trans de PacC(5-678) se correlaciona con una disminución de la relación entre la forma procesada de PacC y los distintos productos primarios de traducción, lo que sugiere que el producto primario de traducción de *pacC* no es inactivo y parece modular negativamente la función *pacC*.

Una exposición mayor del EMSA (Fig. 57B) reveló la presencia de un nuevo complejo (que no había sido previamente detectado) de movilidad electroforética menor a la de los complejos I y II al expresar PacC(5-678) en los tres fondos genéticos, pero no al expresar PacC(305-678). El hecho de que la movilidad electroforética de este nuevo complejo fuera mayor en un fondo *pacC*^{c14} que en los otros dos fondos genéticos, sugiere que el producto primario de traducción está presente en este complejo. La disminución de los niveles del complejo I que se producen al expresar PacC(5-678) en un fondo genético *pacC*^{c14} (*vide supra*) podría explicarse si en la formación del nuevo complejo participara también la forma procesada de la proteína. Estos resultados sugieren que el producto primario de traducción de *pacC* puede promover la formación de complejos proteicos con otras versiones de la proteína, y que su posible actividad moduladora (negativa) de la función *pacC* puede estar relacionada con la formación de estos complejos.

DISCUSIÓN

1. Activación proteolítica de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino.

Según el modelo de Orejas *et al.* (1995) de la regulación por pH ambiental de la expresión génica en *A. nidulans*, PacC se mantiene en una conformación inactiva mediante interacciones intramoleculares en las que participa el extremo carboxilo terminal de la proteína. En respuesta a un pH ambiental alcalino y como consecuencia de la transducción de esta señal mediada por los productos codificados por los genes *pal*, las interacciones intramoleculares se desestabilizan y PacC adquiere una conformación que permite su activación proteolítica mediante la eliminación de unos 400 residuos carboxilo-terminales de la proteína. La forma procesada resultante es capaz de activar la transcripción de genes “alcalinos” y prevenir la transcripción de genes “ácidos”.

La primera parte de los resultados de esta tesis proporciona evidencias a favor de dos aspectos claves de este modelo: (i) la existencia de una relación precursor producto entre las dos formas de PacC y (ii) que el paso regulado por el pH ambiental es la transición de PacC de una conformación no accesible a una conformación accesible a la proteasa procesativa. Adicionalmente, se establece el límite carboxilo terminal de la forma procesada de PacC y se demuestra que el procesamiento no afecta al extremo amino terminal de la proteína.

Los estudios de expresión transitoria confirmaron la hipótesis de la relación precursor producto entre las dos versiones de PacC detectadas en extractos de *A. nidulans*. Estos estudios mostraron, en primer lugar, que el producto primario de traducción de *pacC* tiene una vida media relativamente corta, como resultado de su conversión en la forma procesada de la proteína y, en segundo lugar, que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino codificada por los genes *pal* es necesaria para que PacC pueda procesarse, de forma que la ausencia de una ruta *pal* funcional estabiliza significativamente el producto primario de traducción sin afectar a la estabilidad de la forma procesada de PacC. Estos resultados, sin embargo, no descartan la posibilidad de que la forma procesada de PacC pueda obtenerse por un mecanismo de procesamiento cotraduccional similar al descrito para la obtención de la subunidad p50 de NF- κ B (Lin *et al.*, 1998). Tanto p50 como p105 están codificados por el gen *NFKB1* de forma que el producto primario de traducción de este gen, p105, contiene p50 en su mitad amino terminal. El hecho de que se sintetice p50 o p105 depende de la velocidad de traducción del mRNA de *NFKB1*. Si la velocidad de traducción es rápida, la liberación del polipéptido completo permite su plegamiento rápido y la proteína sintetizada es p105, mientras que si la velocidad de traducción es lenta la degradación proteolítica del extremo carboxilo terminal del polipéptido (que se pliega más lentamente que el extremo amino terminal cuando está unido al ribosoma) mediada por el proteosoma, da lugar a la síntesis de p50. Si un mecanismo similar operara en el caso de PacC (para lo cual no existe evidencia experimental alguna), podría ocurrir que en ausencia de la señal de pH ambiental alcalino la proteína se

plegara correctamente según se fuera traduciendo, obteniéndose la forma entera de la proteína, y que en condiciones de pH ambiental alcalino, la modificación de la proteína mediada por los productos codificados por los genes *pal* impidiera el plegamiento del extremo carboxilo terminal (previniendo las interacciones de este extremo con otros residuos de la proteína) lo que permitiría su degradación proteolítica y la obtención, en consecuencia, de la forma procesada de PacC.

Mediante el uso de una estirpe con una mutación *pacC504*, que resulta en el cambio M5I y obliga al uso del codón AUG1 como codón de inicio de la traducción, se demuestra en esta tesis que el procesamiento proteolítico de PacC no afecta a los residuos del extremo amino terminal de la proteína y que el principal codón AUG de iniciación de la traducción es el codón 5, cuyas secuencias flanqueantes se ajustan mejor que las del codón AUG 1 a la secuencia consenso del entorno de un AUG preferente de iniciación del gen *areA* de *A. nidulans* (Arst y Sheerins, 1996). El hecho de que la mutación *pacC504* no resulte en un fenotipo de pérdida de función indica que el codón 1 puede utilizarse como inicio de la traducción. Es probable, por tanto, que en una estirpe *pacC*⁺ una parte minoritaria de la traducción se inicie en este codón.

La actividad de la proteasa procesativa de PacC no parece estar regulada por el pH ambiental ya que las mutaciones *pacC*^c que resultan en truncamientos de regiones carboxilo-terminales de PacC y mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino se procesan independientemente de cuál sea el pH ambiental (Orejas *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999; sección 1.4.1 de resultados), lo que sugiere que el paso regulado por el pH ambiental es la transición de PacC de una conformación no accesible a una conformación accesible a la proteasa procesativa y no la actividad de la proteasa. Las versiones de PacC con truncamientos del extremo carboxilo terminal, al prevenir las interacciones entre este extremo y otros residuos de la proteína, estarían siempre en una conformación accesible a la proteasa procesativa. Este modelo implica la predicción de que mutaciones que afectaran a otras partes de la proteína podrían disrumpir también las interacciones con el extremo carboxilo terminal y resultar, por tanto, en el procesamiento constitutivo de PacC y en un fenotipo *pacC*^c, y, por otra parte, que las mutaciones que impidieran la recepción de la señal de pH ambiental alcalino o que bloquearan la proteína en la conformación no accesible a la proteasa procesativa resultarían en un fenotipo de pérdida de función que mimetizaría los efectos de un pH ambiental ácido. Las mutaciones *pacC*^c39, *pacC*^c63 y *pacC*^c69, que resultan en los cambios L259R, L266F y L340S, respectivamente, podrían corresponder al primer tipo de las mutaciones indicadas y los residuos L259, L266 y L340 podrían estar, por tanto, implicados directa o indirectamente en las interacciones con el extremo carboxilo terminal de la proteína. El hecho de que versiones de PacC con deleciones entre los residuos 235 y 264 o 251 y 270 se procesen constitutivamente (Elicer Díez, comunicación personal) confirma que las regiones

de PacC próximas al sitio de procesamiento están implicadas en interacciones que previenen el procesamiento y constituye una evidencia en contra de la interpretación alternativa de que las sustituciones L259S y L266F aumenten la afinidad de la proteasa procesativa. La implicación del residuo L340 en interacciones con el extremo carboxilo terminal de la proteína ha sido ya confirmada (resultados de nuestro laboratorio).

Las mutaciones *pacC*^{+/207} y *pacC*^{+/20205} podrían corresponder al segundo tipo de las mutaciones descritas, de forma que tanto el residuo Y455 (sustituido por N en la versión de PacC codificada por *pacC*^{+/207}) como uno o más residuos de la región comprendida entre los aminoácidos 465 y 540 (delección resultante de la mutación *pacC*^{+/20205}) podrían estar implicados en la recepción de la señal de pH ambiental alcalino o en las consecuencias a nivel conformacional resultantes de la recepción de esta señal.

Finalmente, el análisis de los tamaños de versiones de PacC codificadas por una serie de alelos con mutaciones que resultan en truncamientos de la proteína en zonas próximas al límite de procesamiento, en comparación con el tamaño de la forma procesada de PacC, ha permitido determinar la existencia de cierta heterogeneidad en el extremo carboxilo terminal de esta última y establecer dos límites de procesamiento para la proteasa procesativa (sección 1.3 de resultados; Fig. 24). El límite más amino terminal se localiza dentro de la secuencia Lys252-Lys253-Arg254, o en una zona muy próxima a esta secuencia, y el límite más carboxilo terminal estaría separado por, aproximadamente, cuatro residuos del sitio del primer corte.

2. Localización nuclear de PacC en respuesta a un pH ambiental alcalino.

Puesto que el lugar de acción de los factores de transcripción en células eucariotas es el núcleo, una forma posible de regular su actividad consiste en regular su localización nuclear, de forma que el factor de transcripción sólo se localiza en el núcleo en respuesta a las señales ambientales que resultan en su activación. En muchos casos la modulación negativa de la localización nuclear esta mediada por dominios en "cis" que pueden enmascarar una NLS (como en el caso de NF- κ B), interaccionar con otras proteínas que retienen al factor de transcripción en el citoplasma (este es el caso de la proteína Xnf7 de *Xenopus*) o pueden ser necesarios para el anclaje del factor de transcripción a distintas membranas celulares (un ejemplo es la proteína SREBP). En todos estos casos, la activación del factor de transcripción implica la eliminación proteolítica del dominio modulador, lo que permite que el factor de transcripción se localice en el núcleo.

El estudio de la distribución nucleo-citoplásmica de PacC en distintas estirpes de *A. nidulans* ha permitido establecer que el pH ambiental, al regular el cambio entre una conformación no accesible ("cerrada") y una conformación accesible ("abierta") de PacC a la proteasa procesativa, no sólo regula su procesamiento proteolítico (Orejas *et al.*, 1995), sino

también y de forma simultánea su localización nuclear, de forma que la eliminación proteolítica de aproximadamente el 60% de los residuos carboxilo terminales de PacC resulta en su localización nuclear. Así, la forma procesada de PacC se localizó preferentemente en la fracción nuclear y la proteína codificada por *pacC*^{c50}, de tamaño similar a la forma procesada de PacC, también se localizó preferentemente en esta fracción. Por el contrario, en ausencia de una ruta funcional de transducción de la señal de pH ambiental alcalino (mutaciones *pal*), el producto primario de traducción de *pacC*, que se mantiene en una conformación “cerrada” y consecuentemente no se procesa, se localizó casi exclusivamente en el citoplasma. El hecho de que versiones mutantes truncadas de PacC semejantes en tamaño a la forma procesada de la proteína se localizaran preferentemente en el núcleo tanto en un fondo *palA*⁺ como en un fondo *palA1* indica que, como cabría esperar de la relación epistática, la localización nuclear de la forma procesada de PacC es independiente de la transducción de la señal del pH ambiental alcalino.

En una estirpe *pacC*^{c14} (mutación de ganancia de función que resulta en una proteína PacC truncada en el aminoácido 492) la pequeña proporción del producto primario de traducción de *pacC*^{c14} que no se procesa se localizó preferentemente en el núcleo, lo que sugiere que el dominio de PacC que modula negativamente su localización nuclear debe estar comprendido entre los aminoácidos 492 y 678 (extremo carboxilo terminal de la proteína). El hecho de que la expresión de PacC(305-678) (codifica la mitad carboxilo terminal de PacC) en una estirpe *pacC*^{c14} previniera en parte la localización nuclear del producto primario de traducción de *pacC*^{c14} (Fig. 51) refuerza la hipótesis de que el extremo carboxilo terminal de PacC está implicado en la modulación negativa de la localización nuclear de PacC y constituye una evidencia indirecta de que la mitad carboxilo terminal de PacC interacciona con otras partes de la proteína.

La observación de que en una estirpe *pacC*⁺ parte del producto primario de *pacC* se localizó en el núcleo y parte en el citoplasma mientras que en una estirpe *pal* se localizó casi exclusivamente en el citoplasma sugiere que el producto primario de traducción de *pacC* en la conformación “abierta” puede localizarse en el núcleo y que por tanto el pH ambiental probablemente no sólo regula la localización nuclear de PacC al “disparar” el procesamiento proteolítico sino también al provocar el cambio entre las conformaciones “cerrada” y “abierta” de la proteína. Este hecho implicaría además que el extremo carboxilo terminal de PacC sólo modula negativamente su localización nuclear en la conformación “cerrada” de la proteína. Si bien se desconoce el mecanismo mediante el cual tiene lugar esta modulación negativa, podría ocurrir que el extremo carboxilo terminal de PacC (en la conformación cerrada de la proteína) enmascarara una posible señal de localización nuclear (como en el caso de la proteína p105), interaccionara con otra u otras proteínas que retuvieran a PacC en el citoplasma (como en el caso del factor Xnf7 de *xenopus*) o bien que contuviera una señal de exportación nuclear que

DISCUSIÓN

solamente se enmascararía en respuesta a la señal de pH ambiental alcalino. De hecho, podría ocurrir que al igual que en el caso de otros factores de transcripción (como el factor Pho4 de *Sacharomices* o el factor NF-AT en humanos) la localización nuclear de PacC se regulara modulando tanto su importación como su exportación nuclear y la proteína podría contener una señal de importación y otra señal de exportación nuclear. A un pH ambiental ácido la primera estaría enmascarada y la segunda sería accesible al correspondiente receptor/transportador de exportación y en respuesta al pH ambiental alcalino (señal activadora de PacC) se inactivaría la señal de exportación nuclear y la señal de importación se desenmascararía. Los experimentos de esta tesis no están dirigidos a discriminar entre estas posibilidades.

El estudio mediante microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de PacC en medios tamponados a distintos valores de pH permitió comprobar "in vivo" que el pH ambiental regula la localización subcelular de PacC y que la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para esta regulación. Este estudio mostró que en un fondo *paIA*⁺ al aumentar el pH del medio de cultivo PacC se localizó preferentemente en el núcleo, mientras que en un fondo genético *paI* la localización subcelular de PacC fue preferentemente citoplásmica y no varió al aumentar el pH del medio de cultivo. Los mismos resultados se obtuvieron al analizar la distribución núcleo-citoplásmica de GFP::PacC(5-678) (mediante fraccionamiento subcelular y posterior análisis de PacC por EMSA) en un experimento idéntico al realizado *in vivo*, lo que indica que ambos métodos de estudio son internamente congruentes.

La secuencia 252-KKR...KRR-269 de PacC, parte de la cual está incluida en la forma procesada de la proteína, se ajusta perfectamente a la secuencia consenso de una NLS de tipo bipartita. En esta tesis se presentan evidencias de que esta secuencia no es una NLS. En primer lugar, se ha comprobado *in vivo* que esta secuencia no es necesaria para la localización subcelular de versiones de PacC semejantes a la forma procesada de la proteína. Así, las proteínas PacC(5-250)::GFP, PacC(5-265)::GFP y PacC(5-273)::GFP que incluyen versiones de PacC truncadas antes, en un punto intermedio o inmediatamente después de la secuencia 252-KKR...KRR-269, respectivamente, se localizaron preferentemente en el núcleo tanto en un fondo genético *paIA*⁺ como en un fondo genético *paIA1*. En segundo lugar, una región de PacC conteniendo la secuencia 252-KKR...KRR-269 más 10 aminoácidos hacia el extremo amino terminal y 11 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal (*pacC*(241-280)) fue incapaz de dirigir la localización nuclear de la proteína GFP.

El análisis de la versión de PacC codificada por *pacCΔ1* mostró cómo está proteína se procesa constitutivamente y que la forma procesada resultante es indistinguible de la forma procesada de PacC, a pesar de que este alelo codifica una proteína menor (30 residuos menos) que la proteína silvestre y carece del sitio de procesamiento. Este resultado, así como el estudio del procesamiento de proteínas codificadas por alelos con otras deleciones que

también incluían el sitio de procesamiento (Elicer Díez, comunicación personal) sugieren que la delección de esta región favorece el procesamiento de PacC y que la proteasa procesativa de PacC reconoce alguna secuencia o motivo estructural situado en un punto más amino terminal del residuo 235 y corta la proteína en un punto situado en una zona más carboxilo terminal de este residuo (Elicer Díez, comunicación personal). El hecho de que las proteínas quiméricas PacC(5-250)::GFP, PacC(5-265)::GFP y PacC(5-273)::GFP se procesen (si bien este proceso es poco eficaz) en los dos fondos genéticos y que la forma procesada resultante sea de igual tamaño que la forma procesada de PacC está de acuerdo con el hecho de que la secuencia o motivo estructural reconocido por la proteasa procesativa de PacC sea más amino terminal al sitio de corte o límite de procesamiento de esta proteasa (procesamiento de PacC(5-250)::GFP) e indica que los residuos de PacC más carboxilo terminales del aminoácido 250 no contienen elementos de secuencia o estructurales absolutamente esenciales para la obtención de la forma procesada de PacC.

En un principio, proteínas de M_r menor a 40-60 kDa pueden difundir a través de los NPCs mientras que para que proteínas de mayor M_r puedan localizarse en el núcleo deben ser transportadas a su interior mediante un proceso que requiere energía y la presencia en la proteína de una señal de importación al núcleo. La localización preferentemente nuclear de las proteínas de fusión PacC(5-250)::GFP, PacC(5-265)::GFP y PacC(5-273)::GFP cuyas M_r están comprendidos entre 53,571 y 56,341 kDa (Fig. 40C) sugiere que en la región de PacC comprendida entre los aminoácidos 5 y 250 podía haber un determinante de localización nuclear. El estudio *in vivo* de la localización subcelular de las proteínas quiméricas GFP::PacC(5-173), GFP::PacC(66-173), GFP::PacC(66-250) y GFP::PacC(173-250), que contienen GFP y distintas regiones del extremo amino terminal de PacC comprendidas entre los aminoácidos 5 y 250, ha mostrado que los dedos de zinc de PacC son suficientes para localizar la GFP en el núcleo de forma que las tres proteínas quiméricas conteniendo la región de los dedos de zinc (incluyendo GFP::PacC(66-173) que sólo contiene esta región de PacC) se localizaron preferentemente en el núcleo mientras que la localización subcelular de GFP::PacC(173-250), la única de las cuatro proteínas de fusión que no contiene los dedos de zinc, fue indistinguible de la de la GFP (Fig. 48).

La M_r de las proteínas GFP::PacC o PacC::GFP analizadas en esta tesis, que contienen regiones de la mitad amino terminal de PacC y que se localizan preferentemente en el núcleo (todas ellas contienen la región de los dedos de zinc) está comprendida entre 39,878 y 56,341 kDa. Esta M_r ronda el límite de exclusión teórico (40-60 kDa) de los NPCs. Por lo que, en principio, la localización preferentemente nuclear de estas proteínas podría explicarse por dos posibles mecanismos: i) que las proteínas entrasen en los núcleos por difusión y quedasen retenidas en su interior por su unión al DNA y ii) que la secuencia de los dedos de zinc constituya o incluya una señal de importación al núcleo.

Si bien los resultados de esta tesis no permiten descartar formalmente ninguna de estas posibilidades, el mecanismo de la difusión y posterior retención nuclear es poco frecuente y si bien los NPCs aparentemente permiten la difusión entre el citoplasma y el núcleo de proteínas de M_r menor a 40-60 kDa, a excepción de la subunidad catalítica de la PKA (Harootunian *et al.*, 1993) no se ha demostrado que ninguna proteína que desempeña su función en el núcleo pueda entrar en estos orgánulos por difusión, e incluso pequeñas proteínas nucleares, como las histonas, son transportadas activamente al núcleo (Breeuer y Goldfarb, 1990). Por otra parte, al menos en levaduras, existen ejemplos de que la capacidad de unirse al DNA no es suficiente para que las proteínas reguladoras se localicen preferentemente en el núcleo (Silver *et al.*, 1986).

En muchos factores de transcripción la señal de importación nuclear se localiza muy cerca del dominio de unión al DNA. Este es el caso de c-Fos, c-Jun, Myc, Max, MyoD1 (revisado por Boulikas *et al.*, 1994), Gal4p (proteína cuyos 147 primeros aminoácidos son suficientes para que pueda unirse al DNA y localizarse en el núcleo (Chan *et al.*, 1998)), o de factores de transcripción cuyo dominio de unión al DNA (al igual que el de PacC) está formado por tres dedos de zinc del tipo Cys2His2 como el factor Swi5p de levaduras o la poli(ADP-ribosa) polimerasa de humanos, en los que la NLS se localiza muy cerca del extremo carboxilo terminal del tercer dedo de zinc (Moll *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 1992). En dos de los factores de transcripción del último tipo mencionado se ha demostrado que la región de los dedos de zinc contiene una NLS. Así, en el caso de NGFI-A (factor de transcripción que media respuestas celulares en respuesta al factor de crecimiento nervioso) Matheny *et al.* (1994) muestran que los dedos de zinc son necesarios para la localización nuclear de este factor de transcripción y que este requerimiento no es debido a su capacidad de unión al DNA ya que mutaciones en la región de los dedos de zinc que previenen su unión al DNA no previenen su localización nuclear y mutaciones en esta región que previenen la localización nuclear no previenen su unión al DNA. Asimismo estos autores muestran que la estructura de los dedos de zinc es fundamental para que esta región sea funcional como un dominio de importación al núcleo. En el caso del factor de transcripción GKLF, Shields y Yang, (1997) muestran la existencia en esta proteína de dos señales de importación al núcleo, una en la región inmediatamente amino terminal de los dedos de zinc, que se ajusta a la secuencia consenso de las NLSs y una segunda, que no se ajusta a esta secuencia consenso, localizada en la región de los dedos de zinc.

El análisis mediante EMSA de las proteínas de fusión entre GFP y distintas regiones del extremo amino terminal de PacC (Fig. 49B) ha permitido comprobar que la movilidad de los complejos de retardamiento formados por las dos proteínas de fusión GFP::PacC que contienen versiones de PacC que carecen de la región comprendida entre los aminoácidos 5 y 65 (región rica en alaninas) es anormalmente elevada con respecto a la del complejo formado

por la forma procesada de PacC. Una posible explicación podría ser que dicha región estuviera implicada directa o indirectamente en una interacción de PacC con otra/s proteína/s (incluyendo PacC) de forma que PacC no se uniera al DNA como un monómero sino como un componente de un complejo dimérico y sólo en ausencia de la región rica en alaninas (proteínas GFP::PacC(66-173) y GFP::PacC(66-250)), al no poder formar parte de este complejo, se uniera como un monómero al DNA. Resultados recientes obtenidos en el laboratorio (Eliecer Díez, comunicación personal) muestran cómo en un fraccionamiento de un extracto proteico crudo de una estirpe *pacC*⁺, mediante una columna de filtración en gel, tanto la forma sin procesar como la forma procesada de PacC eluyen en fracciones a las que eluyen proteínas de M_r del orden de dos veces superior al estimado para cada una de estas dos formas de la proteína, lo que sugiere que PacC podría encontrarse normalmente asociado con el propio PacC formando dímeros o bien que podría estar asociado con otra u otras proteínas. La posible dimerización de las proteínas de fusión GFP::PacC o PacC::GFP que contienen regiones de la mitad amino terminal de PacC que incluyen la región rica en alaninas y se localizan preferentemente en el núcleo, daría lugar a la formación de complejos proteicos con una M_r comprendida entre 90,914 y 112,682 kDa, claramente superior al límite de exclusión teórico (40-60 kDa) de los NPCs, lo que descartaría un mecanismo de localización nuclear por difusión (y posterior retención en el interior nuclear) e indicaría que la secuencia de los dedos de zinc constituye o incluye una señal de importación nuclear.

3. *pacC* no regula positivamente su propia expresión.

Según el modelo de Orejas *et al.* (1995) la forma procesada de PacC es la forma activa capaz de activar la transcripción de genes “alcalinos” y prevenir la transcripción de genes “ácidos”. La hipótesis de la autorregulación positiva de *pacC* implica que la forma procesada de PacC debe activar la transcripción de *pacC*. En la tercera parte de los resultados de esta tesis se muestran evidencias en contra de una autorregulación positiva de *pacC*. Por ejemplo, se demuestra que una versión de PacC funcional (PacC(5-265)) semejante en tamaño a la forma procesada de la proteína y capaz de activar la expresión de genes “alcalinos”, no es capaz de activar la transcripción de *pacC*.

Los alelos *pacC*^c son alelos de ganancia de función que mimetizan los efectos de un medio de cultivo alcalino (Tilburn *et al.*, 1995) y codifican versiones de PacC que se procesan constitutivamente (Orejas *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999), mientras que los alelos *pacC*^{+/−}, por el contrario, son alelos de pérdida de función que mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido (Tilburn *et al.*, 1995). La hipótesis de la autorregulación positiva de *pacC* implica que la coexpresión de un alelo *pacC*^c y un alelo *pacC*⁺ debería resultar en niveles de PacC más

elevados que los resultantes de la coexpresión de dos alelos *pacC*⁺ o un alelo *pacC*⁺ y un alelo *pacC*^{+/}. El análisis de PacC en tres estirpes diploides, permitió observar que, tanto en condiciones de cultivo ácidas como alcalinas, se detectaron en los tres casos niveles de la forma sin procesar de PacC muy parecidos y muy semejantes a los detectados en una estirpe *pacC*⁺ y que en el diploide *pacC*^{+/}/*pacC*^{+/}-7604 los niveles detectados de la versión de PacC codificada por el alelo *pacC*^{+/}-7604 eran muy similares en las dos condiciones de cultivo, a pesar de que en condiciones de cultivo alcalinas se detectaron niveles de la forma procesada de PacC muy superiores a los detectados en condiciones de cultivo ácidas. Estos resultados, si bien constituyen una evidencia de tipo indirecto, están en contra de una autorregulación positiva de *pacC*.

La expresión condicional de *pacC*(5-265) tanto en un fondo genético *pacC*^{+/}-7604 como en un fondo genético *pa/A1* (ambas mutaciones mimetizan los efectos de un medio de cultivo ácido) ha permitido establecer, en primer lugar, que (en condiciones de inducción) este alelo de *pacC* es un alelo de ganancia de función, dominante sobre *pacC*^{+/}-7604 y epistático sobre la mutación *pa/A1*, y, en segundo lugar, que la expresión del producto génico de este alelo no induce la expresión del gen *pacC* residente. Así, si bien en los dos fondos genéticos la expresión de *pacC*(5-265) resultó en un fenotipo que mimetiza los efectos de un medio de cultivo alcalino, en ninguno de los dos casos aumentaron los niveles de expresión del gen *pacC* residente, a pesar de que la expresión de *PacC*(5-265) resultó en un aumento de la transcripción de *ipnA*, un gen estructural "alcalino". Estos resultados son incompatibles con un modelo de autorregulación positiva de *pacC*.

El análisis de PacC por EMSA permitió observar que tanto la expresión de *PacC*(5-265) como de *PacC*(5-678) en un fondo genético *pacC*^{+/}-7604 resultó en una disminución (similar en ambos casos) de los niveles del complejo formado por el producto de *pacC*^{+/}-7604 y de la sonda libre. Esta desaparición simultánea del complejo y de la sonda libre sugiere que las versiones de PacC resultantes de la inducción de *pacC*(5-265) y *pacC*(5-678) (cuya afinidad por el DNA aparentemente no es mayor que la de la proteína codificada por *pacC*^{+/}-7604) podrían favorecer que la proteína PacC codificada por *pacC*^{+/}-7604 formara parte de un complejo proteico capaz de unirse al DNA, pero lo suficientemente grande como para ser excluido del gel.

4. El producto primario de traducción de *pacC* puede modular negativamente la función *pacC*.

Si bien el modelo de Orejas *et al.* (1995) de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans* propone que la única forma funcional de PacC es la forma procesada de la proteína,

los resultados obtenidos del análisis fenotípico y del análisis de PacC en estirpes merodiploides para *pacC* sugieren que el producto primario de traducción puede modular negativamente la función *pacC*. En primer lugar, el análisis fenotípico mostró que tanto en una estirpe *pacC*⁺, como en una estirpe *pacC*^{c14}, la sobreexpresión de PacC(5-678) resulta en una disminución de la función *pacC* y que el alelo *pacC*(5-678) (en condiciones de inducción) es un dominante negativo del alelo *pacC*^{c14}. En segundo lugar, el análisis por EMSA de PacC en las estirpes merodiploides mostró que en todos los casos la expresión de PacC(5-678) resultó en un aumento de los niveles de producto primario de traducción (con respecto a las estirpes receptoras de transformación). En una estirpe *pacC*^{c14} no sólo se incrementó el complejo correspondiente a los productos primarios de traducción (codificados por los alelos *pacC*^{c14} y *pacC*(5-678)) sino que los niveles de la forma procesada de la proteína disminuyeron notablemente. Por lo tanto, la pérdida de función *pacC* resultante de la expresión de PacC(5-678) se correlacionó con un aumento de los niveles de producto primario de traducción y la disminución en el fondo *pacC*^{c14} del producto de procesamiento. Estos resultados indican que la función *pacC* estaría determinada por la relación entre la forma procesada de PacC y el producto primario de traducción (de forma que cuanto mayor es esta relación mayor es la función *pacC*), lo que por extensión implica que el producto primario de traducción no es inactivo y parece modular negativamente la función *pacC*.

La activación de muchos factores de transcripción tiene lugar mediante reacciones de fosforilación-defosforilación, de forma que lo que determina la actividad del factor es el grado de fosforilación. Este sistema permite que la activación sea un proceso completamente reversible y en ausencia de la señal activadora el factor de transcripción retorne a su estado inactivo. Recientemente se ha empezado a caracterizar un número cada vez mayor de factores de transcripción que se activan mediante un procesamiento proteolítico que implica la eliminación de dominios en "cis" que modulan negativamente su actividad. Uno de los inconvenientes de este mecanismo de activación es su irreversibilidad, de forma que en ausencia de la señal activadora el factor de transcripción no puede retornar a su estado inactivo. Un posible mecanismo de inactivación de estos factores de transcripción consiste en que tanto el producto primario de traducción como la forma procesada sean funcionales, pero que o bien desempeñen funciones opuestas, o bien que el producto primario de traducción pueda modular negativamente la actividad del producto procesado. Ci constituye un ejemplo en el que ambas formas de la proteína desempeñan funciones opuestas. Ci forma parte de un complejo proteico formado por esta proteína y las proteínas Fu, Sufu y Costal que se mantiene unido a los microtúbulos mediante esta última proteína (Ingham, 1998). En ausencia de la señal Hh Ci se procesa proteolíticamente dando lugar a una versión procesada de la proteína (Ci75) que contiene el motivo de unión al DNA, se localiza en el núcleo y reprime la expresión de algunos de los genes regulados por la señal Hh (Aza-Blanc *et al.*, 1997). En presencia de esta

señal Ci no se procesa, se modifica y actúa como un activador transcripcional (Méthot y Basler, 1999). NF- κ B constituye un ejemplo en el que el producto primario de traducción modula negativamente la actividad del factor de transcripción. El gen NF κ B1 puede dar lugar a dos proteínas Rel diferentes, p105 (el polipéptido completo) o p50, que es la parte amino terminal del polipéptido (Ghos *et al.*, 1990; Kieran *et al.*, 1990). p50 es una de las proteínas Rel capaces de formar el factor de transcripción NF- κ B mediante su asociación con otras proteínas Rel como p65. P105, al igual que p50, puede asociarse con otras proteínas Rel pero en este caso, se forma un complejo inactivo que queda retenido en el citoplasma debido a que el extremo carboxilo terminal de p105 enmascara la NLS de p50 previniendo la localización nuclear del complejo.

A lo largo de esta tesis se muestran diversas evidencias a favor de que PacC puede interactuar con el propio PacC formando complejos proteicos que pueden incluir ambas formas de la proteína (forma procesada y producto primario de traducción). Así, tanto al expresar PacC(5-678) como PacC Δ 1 en los fondos genéticos Δ *pacC*, *pacC*⁺ y *pacC*^{c14} se formó un complejo de retardamiento cuya movilidad electroforética sugiere que los productos primarios de traducción (de los alelos sobreexpresado y residente) pueden estar implicados en su formación y, adicionalmente, la disminución de forma procesada de PacC que se produjo al expresar PacC(5-678) en un fondo *pacC*^{c14} podría explicarse si en la formación de este nuevo complejo participara también esta forma de la proteína; tanto la expresión de PacC(5-678) como de PacC(5-265) en un fondo genético *pacC*^{+/-} 7604 pareció inducir la formación de un complejo que incluía la proteína codificada por este alelo y, finalmente, el análisis por EMSA de proteínas de fusión entre GFP y distintas regiones del extremo amino terminal de la proteína parece indicar que la región de PacC comprendida entre los aminoácidos 5 y 65 (región rica en alaninas) puede estar implicada en la asociación de PacC con el propio PacC o con otras proteínas. Estos datos sugieren que el producto primario de traducción de *pacC* puede interactuar con esta misma forma de la proteína o con otras versiones de PacC y que su posible función moduladora (negativa) de la función *pacC* puede estar relacionada con la formación de estos complejos. Como en el caso de NF- κ B podría ocurrir que se formaran heterodímeros o heteromultímeros conteniendo una o más moléculas del producto primario de traducción y una o más moléculas de la forma procesada de PacC. Estas últimas, al estar formando parte del complejo, no podrían localizarse en el núcleo, bien por no poder difundir a través de los NPCs (en el caso de que la forma procesada de PacC entrara en el núcleo por difusión), bien porque la supuesta señal de importación nuclear (contenida en o formada por los dedos de zinc) estuviera enmascarada o bien porque la presencia de una señal de exportación nuclear en la región carboxilo terminal del producto primario de traducción mantuviera el complejo excluido del interior nuclear.

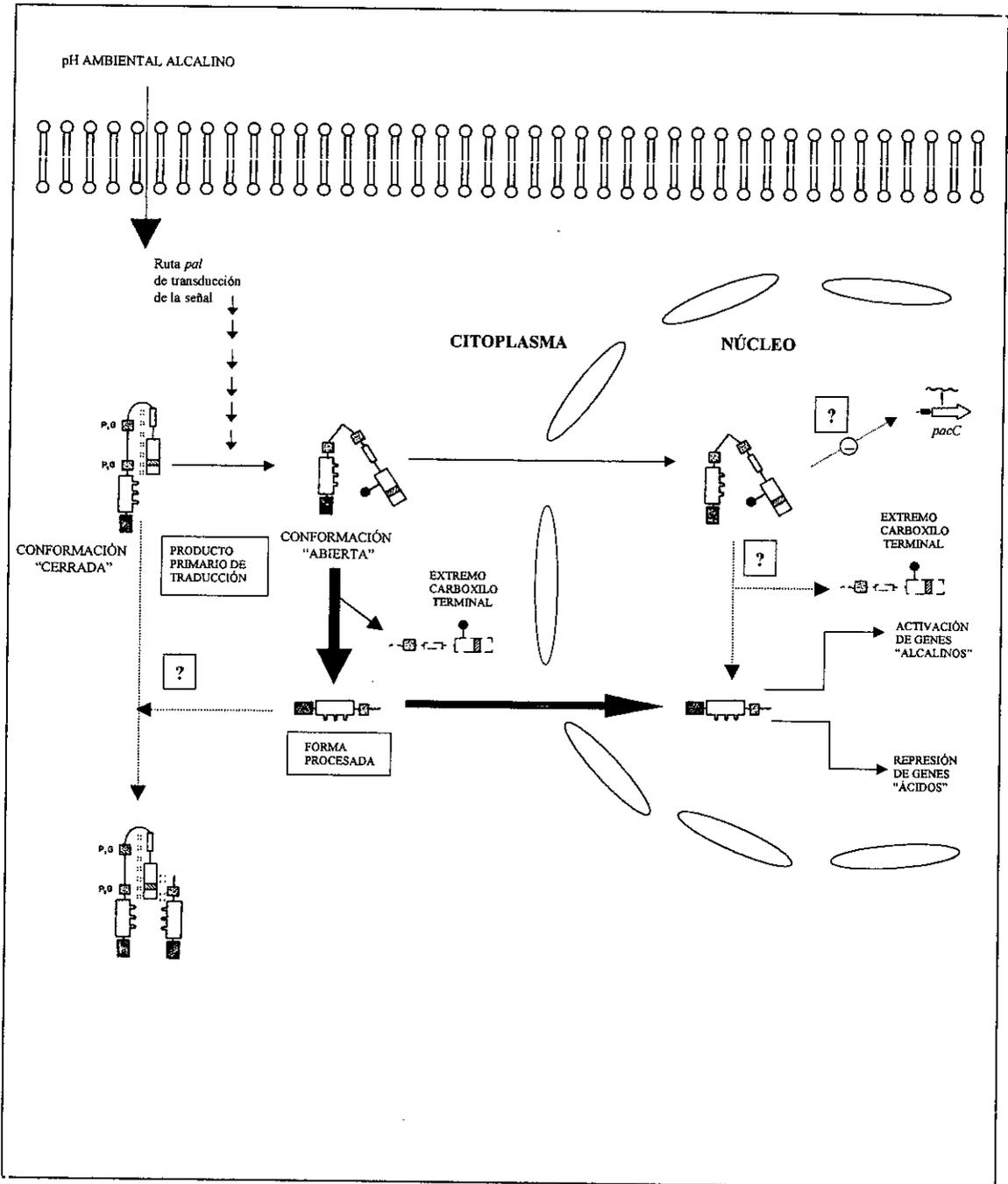
El hecho de que el producto primario de *pacC* pueda modular negativamente la función *pacC* mediante la inactivación de la forma procesada de la proteína, podría ser la clave que permitiera una rápida adaptación a una transición de un pH ambiental alcalino a un pH ácido y resolvería el problema de la irreversibilidad de la activación proteolítica de PacC.

Un mecanismo alternativo de la posible función moduladora (negativa) del producto primario de traducción de *pacC* no excluida formalmente por estos resultados es que esta forma de la proteína actúe como un represor transcripcional del propio *pacC*. Si bien hasta el momento no se dispone de ninguna evidencia directa a favor o en contra de esta posibilidad, el hecho de que en un fondo *paIA*⁺ parte del producto primario de traducción de *pacC* se localice en el núcleo sugiere que esta forma de la proteína puede desempeñar alguna función en este compartimento celular. Alternativamente, la presencia de parte del producto primario de traducción en el núcleo en este fondo genético, podría explicarse si PacC se procesara en el interior nuclear.

PacC constituye un modelo extremadamente útil para el estudio de la regulación por proteólisis de la activación de factores de transcripción. El hecho de disponer de un número extremadamente alto de mutaciones tanto de ganancia como de pérdida de función en el gen *pacC*, haberse clonado todos los genes de la ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino (señal activadora), disponer de mutaciones de pérdida de función en todos estos genes así como de técnicas de biología molecular ampliamente desarrolladas, está permitiendo una caracterización genética y molecular extraordinariamente detallada del mecanismo de activación de PacC, que permitirá entender algunas de los aspectos clave de estos mecanismos de activación.

5. Actualización del modelo de regulación por pH ambiental en *A. nidulans*.

En la figura 58 se muestra un modelo de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans* basado en el modelo de Orejas *et al.* (1995) en el que se incluyen las aportaciones de los resultados de esta tesis. Una de las aportaciones más importantes del trabajo de esta tesis es que el pH ambiental regula la localización subcelular de PacC, el factor de transcripción que media la regulación de la expresión génica en respuesta al pH. En respuesta a un pH ambiental alcalino y como consecuencia de la acción de los productos codificados por los genes *pal* (constituyen la ruta de transducción de esta señal) PacC experimenta un cambio conformacional que permite su procesamiento proteolítico y, como consecuencia de este procesamiento (que elimina aproximadamente el 60% de los residuos a partir del extremo carboxilo terminal de la proteína) su localización nuclear. Así, la forma procesada de PacC, que es capaz de activar la transcripción de los genes “alcalinos” y prevenir la de los genes “ácidos”,



se localiza preferentemente en el núcleo. En ausencia de una ruta *pal* funcional, al no poder producirse el cambio conformacional, el producto primario de traducción de *pacC* no se procesa y PacC se localiza preferentemente en el citoplasma. El hecho de que a diferencia de lo que ocurre en una estirpe *pal* en una estirpe silvestre parte del producto primario de traducción de *pacC* se localice en el citoplasma y parte en el núcleo, sugiere que solamente en la conformación "cerrada" el extremo carboxilo terminal de PacC modula negativamente la localización nuclear y, por tanto, que el pH ambiental probablemente no sólo regula la localización nuclear de PacC al disparar el procesamiento proteolítico sino también al provocar el cambio conformacional de la proteína.

En esta tesis, además, se han abordado algunos de los aspectos clave del procesamiento de PacC en respuesta al pH ambiental alcalino, no resueltos en el modelo de Orejas *et al.* (1995). En primer lugar, se ha confirmado formalmente la existencia de una relación precursor-producto entre el producto primario de traducción de *pacC* y la forma procesada de la proteína y la necesidad de la ruta *pal* de transducción de la señal de pH ambiental alcalino para que PacC pueda procesarse. En segundo lugar, se describen mutaciones que favorecen la hipótesis de que el paso regulado por el pH ambiental alcalino es la transición entre una conformación no accesible y una conformación accesible a la proteasa procesativa. En tercer lugar, se establece que el procesamiento proteolítico de PacC no afecta al extremo amino terminal de la proteína; que el codón principal de inicio de traducción es el

Figura 58. Modelo molecular actualizado de la regulación por pH en *A. nidulans*. El producto primario de traducción de *pacC* se mantiene en una conformación inactiva mediante interacciones intramoleculares entre la región carboxilo terminal de la proteína y otros residuos. En respuesta a un pH ambiental alcalino los productos codificados por los genes *pal* de la ruta de transducción de la señal introducen una modificación en la proteína que permite la eliminación proteolítica de ~ el 60% de los residuos de la región carboxilo terminal. La forma procesada resultante, que presenta cierta heterogeneidad en el extremo carboxilo terminal, se localiza en el núcleo, donde es capaz de activar la transcripción de genes "alcalinos" y prevenir la transcripción de genes "ácidos". El producto primario de *pacC* parece modular negativamente la función de este factor de transcripción. El hecho de que en un fondo *palA*⁺, pero no en un fondo *palA1*, parte del producto primario de traducción se localice en el núcleo, sugiere que el cambio conformacional por sí solo permite que PacC se localice en el núcleo. Asimismo, la presencia de parte del producto primario de traducción en el núcleo podría explicarse si esta forma de la proteína actuara como un regulador negativo de la transcripción del propio *pacC* o, alternativamente porque el procesamiento proteolítico tuviera lugar en el interior nuclear. Alternativamente, el producto primario de traducción podría modular negativamente la función *pacC* mediante la formación de heterodímeros o heteromultímeros que retuvieran la forma procesada de la proteína en el citoplasma. Las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal*, al bloquear el cambio conformacional de PacC, previenen el procesamiento proteolítico y resultan en una desrepresión constitutiva de la expresión de genes "ácidos" y en la falta de activación de la expresión de los genes "alcalinos" (Fenotipo de mimesis de acidez). Las mutaciones *pacC*^c previenen las interacciones intramoleculares permitiendo el procesamiento de PacC incluso en ausencia de una ruta *pal* funcional y resultan en un fenotipo de mimesis de alcalinidad.

DISCUSIÓN

codón AUG5; que el extremo carboxilo terminal de la forma procesada de PacC no es homogéneo (de forma que la proteasa procesativa puede cortar en dos sitios diferentes, uno localizado en la secuencia Lys252-Lys253-Arg254 o en una zona muy próxima a esta secuencia y el otro, más carboxilo terminal, separado por cuatro residuos del primero).

Finalmente, los resultados de esta tesis, en oposición al modelo establecido por Orejas *et al.*, (1995), muestran que *pacC* no regula positivamente su propia expresión y proporcionan evidencias a favor de que el producto primario de traducción de *pacC* no es inactivo y parece modular negativamente la función *pacC*. Si bien se desconoce el posible mecanismo modulador, se han obtenido resultados que parecen indicar que PacC puede formar parte de complejos proteicos que podrían incluir las dos formas de la proteína (producto primario de traducción y forma procesada de la proteína) y que la formación de estos complejos podría estar relacionada con la función moduladora del producto primario de traducción. Estos resultados, no obstante, no descartan la posibilidad de que el producto primario de traducción de *pacC* pueda ser un represor transcripcional del propio *pacC*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La forma procesada de PacC proviene del procesamiento proteolítico del producto primario de traducción de *pacC*. La ruta de transducción de la señal de pH ambiental alcalino es necesaria para que este procesamiento tenga lugar.
- 2) El procesamiento de PacC no afecta al extremo amino terminal de la proteína. El principal codón de inicio de la traducción es el codón AUG 5.
- 3) El procesamiento de PacC da lugar, al menos, a dos formas procesadas de tamaño muy similar. El sitio de corte más amino terminal de la proteasa procesativa de PacC está en el triplete Lys252-Lys253-Arg254 o en su inmediata vecindad.
- 4) El paso regulado por el pH ambiental es muy probablemente el cambio entre una conformación no accesible y una conformación accesible a la proteasa procesativa.
- 5) El pH ambiental, al regular el procesamiento de PacC, regula simultáneamente su localización nuclear. La ruta de transducción de la señal de pH ambiental codificada por los genes *pal* es necesaria para esta regulación. La conformación no accesible a la proteasa procesativa previene la localización nuclear de PacC.
- 6) La secuencia 252 KKR...KRR 269 no es necesaria para localización nuclear de la forma procesada de PacC.
- 7) La región de los dedos de zinc de *pacC* es necesaria para la localización nuclear de proteínas PacC semejantes a la forma procesada de la proteína.
- 8) La forma procesada de PacC no regula positivamente la expresión de *pacC*.
- 9) El producto primario de traducción de *pacC* modula negativamente la función *pacC*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, E. J. y S. A. Adam (1994)** Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **125** (3):547-555.
- Adams, T. H., M. T. Boylan y W. E. Timberlake (1988)** brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54** (3):353-362.
- Akamaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou D.X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H. y Ishii, S. (1997)** Drosophila CBP is a coactivator of cubitus interruptus in Hedgehog signalling. *Nature*, **386**: 735-738.
- Anderson, k.V. y Nüslein-Volhard, C. (1986)** Dorsal-group genes of Drosophila. In *Gamitogenesis and the Early Embryo*, ed. J Gall, pp. 177-94. New York: Liss.
- Arst, H. N., Jr. y A. Sheerins (1996)** Translational competence, "leaky scanning" and translational initiation in *areA* mRNA of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **19**:1019-1024.
- Arst, H.N., Jr y Scazzocchio, C. (1985)** Formal genetics and molecular biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. In *Gene Manipulations in Fungi*. Bennett, J.W. and Lasure, L.L. (eds). New York: Academic Press, pp. 309-343.
- Arst, H.N., Jr, Bailey, C.R. y Penfold, H.A. (1980)** A possible role for acid phosphatase in γ -amino-butyrate uptake in *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology*, **125**, 153-158.
- Arst, H.N., Jr, Bignell, E. y Tilburn, J. (1994)** two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 787-790.
- Arst, H.N., Jr, y Cove, D.J. (1970)** Molybdate metabolism in *Aspergillus nidulans*. II. Mutations affecting phosphatase activity or galactose utilization. *Molecular and General Genetics*, **108**, 146-153.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand y R. J. Lake (1999)** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284** (5415):770-776.
- Aza-Blanc, P., F. A. Ramirez-Weber, M. P. Laget, C. Schwartz, y T. B. Kornberg (1997)** Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**:1043-1053.
- Bachman, B.J. (1984)** Linkage map of *Escherichia coli* K-12. In Genetic maps 1984. O'Brien, S.J. (ed). Cold Spring Harbor; New York. pp. 145-161.
- Baeuerle, P.A. y Baltimore, D. (1996)** NF- κ B: ten years later. *Cell* **87**: 13-20.
- Bailey, C. y H. N. Arst, Jr. (1975)** Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **51**:573-577.
- Baldwin, A.S. (1996)** the NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 649-81.
- Beals, C. R., N. A. Clipstone, S. N. Ho, y G. R. Crabtree (1997)** Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* **11** (7):824-834.
- Berg, J. M. y Y. G. Shi. (1996)**. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. *Science* **271**:1081-1085.
- Bergmann, A., D. Stein, R. Geisler, S. Hagenmaier, B. Schmid, N. Fernandez, B. Schnell, y C. Nusslein-Volhard (1996)**. A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in Drosophila. *Mech. Dev* **60** (1):109-123.
- Betts, J. C. y G. J. Nabel (1996)** Differential regulation of NF- κ B(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol Cell Biol* **16** (11):6363-6371.

- Bischoff, F. R. y H. Ponstingl (1991)** Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354** (6348):80-82.
- Bischoff, F. R. y H. Ponstingl (1995)** Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol.* **257**:135-44:135-144.
- Bischoff, F. R., H. Krebber, E. Smirnova, W. Dong, y H. Ponstingl (1995)** Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran- GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* **14** (4):705-715.
- Bodie, E. A., Bower, B., Berka, R. M. y Dunn-Coleman, N. S. (1994)** Economically important organic acid enzyme products. In *Aspergillus: 50 years on*. Martinelli, S. D. y Kinghorn, J. R. (eds). Elsevier. Amsterdam. pp. 561-602.
- Boulikas, T. (1994)** Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J.Cell Biochem.* **55** (1):32-58.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
- Breeuwer, M. y D. S. Goldfarb (1990)**. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* **60** (6):999-1008.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. y Ballard, D.W. (1995)** Coupling of a signal response domain in I κ B α to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2809-2818.
- Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, y U. Siebenlist (1995)** Control of I κ B proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**:1485-1491.
- Brown., M. S. y J. L. Goldstein (1997)** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**:331-340.
- Caddick, M. X. y Arst, H.N., Jr. (1986)** Structural genes for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, **47**, 83-91.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. y Arst, H. N. Jr. (1986a)** Regulation of gene expression by the pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 346-353.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. y Arst, H. N. Jr. (1986b)** Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. *Genet. Res. Camb.* **47**, pp 93-102.
- Calkhoven, C. F. y Geert AB (1996)** Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* **317**:329-342.
- Clutterbuck, A. J. (1990)** *Aspergillus nidulans*. In *Genetic Maps. Locus maps of complex genomes*. Fifth edition. Stephen O'brien (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 3.97 – 3.110.
- Clutterbuck, A.J. (1982)** *Aspergillus nidulans*. *Genet. Maps.* **2**: 209-217.
- Cohen, J. (1991)** Clinical manifestations and management of aspergillosis in the compromised patient. In *fungal Infection in the Compromised Patient*. Warnock, D.W. y Richardson, M.D. (eds). Chichester: John Wiley and Sons. pp. 118-152.
- Coutavas, E., M. Ren, J. D. Oppenheim, P. D'Eustachio y M. G. Rush (1993)** Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* **366** (6455):585-587.
- Cove, D. J. (1966)** The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim.Biophys.Acta* **113**:51-56.

- Champe, S.P., Nagle, D.L. y Yager, L.N. (1994)** Sexual sporulation. In *Aspergillus: 50 years on*. Martinelli, S.S. y Kinghorn, J.R. (eds). Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Chan, C. K., S. Hubner, W. Hu y D. A. Jans (1998)**. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther.* **5** (9):1204-1212.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombello, V., Melandri, F., Scheler, D., Ballard D. y Maniatis, T. (1995)** Signal-induced site specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**: 1586-1597.
- Chi, N. C., E. J. Adam, G. D. Visser y S. A. Adam (1996)** RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J. Cell Biol.* **135** (3):559-569.
- Chiu, W., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi y J. Sheen (1996)** Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* **6** (3):325-330.
- Davidov, L.S., O'Donell, M.M., Kaezmarek, F.S., Pereira, D.A., DeZeeuw, J.R. y Franke, A. E. (1987)** Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **169**, 4621-4629.
- Davis, L. I. (1995)** The nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:865-96:865-896.
- Denison, S. N., M. Orejas, y H. N. Arst, Jr. (1995)** Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **270**:28519-28522.
- Denison, S.H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J. M., Tilburn, J., Mayer, W.,A., Goel, A., Espeso, E.A., Peñalva, M.A. y Arst, H.N., Jr. (1998)** Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol* **30** (2) 259-264.
- DeTilly, G., Mou, D. G. y Cooney, C. L. (1983)** Optimization y economics of antibiotics production. In *The filamentous Fungi Vol. IV: Fungal Technology*. Smith, J. E., Berry, D. R. y Kristiansen, B. (eds). Edward Arnold Ltd. y Butler y Tanner Ltd. London. pp. 190-209.
- Dingwall, C. y R. A. Laskey (1991)** Nuclear targeting sequences. A consensus? *Trends. Biochem. Sci.* **16** (12):478-481.
- Dorn, G. (1965a)** Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, **6**, 13-26.
- Dorn, G. (1965b)** Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. *Science*, **150**, 1183-1184.
- Doye, V. y E. Hurt (1997)**. From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (3):401-411.
- Duncan, E. A., M. S. Brown, J. L. Goldstein y J. Sakai (1997)** Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu- Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* **272**:12778-12785.
- Espeso E.A. (1994)** Control por genes reguladores de amplio dominio de la biosíntesis de penicilinas en *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral. Fac. de Biología. Dep de Microbiología. Universidad Complutense de Madrid.
- Espeso, E. A. y M. A. Peñalva (1992)** Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **6**:1457-1465.
- Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sánchez-Pulido, C. V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst, Jr., y M. A.**

- Peñalva (1997).** Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**:466-480.
- Espeso, E.A. y Peñalva, M.A. (1996)** Three binding sites of the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N Synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 28825-28830.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. y Peñalva, M.A. (1993)** pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-3956.
- Fan C. M. y T. Maniatis (1991)** Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* **354**:395-398.
- Feinberg, A. P. y B. Vogelstein (1984)** "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Anal. Biochem.* **137** (1):266-267.
- Felenbok, B. y Kelly, J.M. (1996)** In *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology* (Brambl, R. and Marzluf, G., eds) pp. 369-380, Springer-Verlag, Berlín.
- Fernandez-Abalos, J. M., H. Fox, C. Pitt, B. Wells y J. H. Doonan (1998).** Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **27** (1):121-130.
- Fernández-Cañón, J. M. y M. A. Peñalva (1995)** Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:110-118.
- Fidel, S., J. H. Doonan y N. R. Morris (1988).** *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin. *Gene* **70** (2):283-293.
- Fischer, U., E. Darzynkiewicz, S. M. Tahara, N. A. Dathan, R. Luhrmann, y I. W. Mattaj (1991)** Diversity in the signals required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport. *J. Cell Biol.* **113** (4):705-714.
- Flanagan, W. M., B. Corthesy, R. J. Bram y G. R. Crabtree (1991)** Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352** (6338):803-807.
- Fujihara, S. M. y S. G. Nadler (1998).** Modulation of nuclear protein import: a novel means of regulating gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **56** (2):157-161.
- Futai, E., T. Maeda, H. Sorimachi, K. Kitamoto, S. Ishiura, y K. Suzuki (1999).** The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **260**:559-568.
- Ghos, S., May, M.J. y Kopp, E.B. (1998)** NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260.
- Ghosh, S., A. M. Gifford, L. R. Riviere, P. Tempst, G. P. Nolan, y D. Baltimore (1990)** Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* **62**:1019-1029.
- Gielkens M., González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., van de Vondervoort, P., de Graaff, L., Visser, J. y Ramón D. (1999)** The *abfB* gene encoding the major α -L-arabinosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. *Microbiology* **145**: 735-741.
- Gorlich, D. (1997)** Nuclear protein import. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (3):412-419.
- Gorlich, D. (1998)** Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* **17** (10):2721-2727.
- Gorlich, D. y I. W. Mattaj (1996).** Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271** (5255):1513-1518.

BIBLIOGRAFÍA

- Gorlich, D., N. Pante, U. Kutay, U. Aebi y F. R. Bischoff (1996)** Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15** (20):5584-5594.
- Greenwald, I. (1998)** LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* **12** (12):1751-1762.
- Grilli, M., Chiu, J.J-S. y Lenardo, M. (1993)** Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.* **143**: 1-62.
- Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Williams, S.A., Garven, S. y Davies, R.W. (1987)** Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglyucanase from *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **5**: 713-719.
- Haas, J., E. C. Park y B. Seed (1996)** Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr.Biol.* **6** (3):315-324.
- Halfon, M.S., Hashimoto, C. y Keshishian, H. (1995)** The *Drosophila toll* gene functions Zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development. *Dev. Biol.* **169**: 151-167.
- Hamer, J. E. y W. E. Timberlake (1987)** Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter. *Mol.Cell Biol.* **7** (7):2352-2359.
- Hames, B.D. (1990)** One-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, pp. 1-147. In B. D. Hames and D. Rickwood (ed.) Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. ERL Press, Oxford, United Kingdom.
- Han, K. y J. L. Manley (1993)** Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO J.* **12** (7):2723-2733.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** (4):557-580.
- Hanover, J.A. (1992)** The nuclear pore: at the crossroads. *FASEB, J.* **6**: 2288-2295.
- Harootunian, A. T., S. R. Adams, W. Wen, J. L. Meinkoth, S. S. Taylor y R. Y. Tsien (1993)** Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol.Biol.Cell* **4** (10):993-1002.
- Henkel, T., U. Zabel, K. van Zee, J. M. Muller, E. Fanning y P. A. Baeuerle (1992)** Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* **68** (6):1121-1133.
- Hoffman, J.A. (1995)** Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 4-10.
- Hopper, A. K., H. M. Traglia y R. W. Dunst (1990)** The yeast RNA1 gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. *J.Cell Biol.* **111** (2):309-321.
- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K. Goldstein, J.L. y Brown M.S. (1995)** Hairpin orientation of sterol regulatory element binding protein-2 in cell membranes as determined by proteasa protection. *J. Biol. Chem.* **270**: 29422-29427.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L. y Wang, X. (1993)** Srebp-2, a second basic helix-loop-helix leucine Zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11603-11607.
- Hutchings, H., Stahmann, K.-P., Espeso, E.A., Timberlake, W.E., Arst, H.N., Jr. y Tilburn J. (1999)** The multiply-regulated *gabA* gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: a score of exons. *Mol Microbiol*, **32** (3), 557-568.

- Imbert, V., R. A. Rupec, A. Livolsi, H. L. Pahl, E. B. M. Traenckner, C. MuellerDieckmann, D. Farahifar, B. Rossi, P. Auburger, P. A. Baeuerle, y J. F. Peyron (1996) Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* **86**(5):787-798.
- Ingham, P. W (1998) Transducing Hedgehog: The story so far. *EMBO, J.* **17** (13) 3505-3511.
- Ip, Y.T. y Levine, M. (1994) Molecular genetics of *Drosophila* immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 672-677.
- Izaurralde, E., U. Kutay, C. von Kobbe, I. W. Mattaj y D. Gorlich (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16** (21):6535-6547.
- Jans, A. D. y Hübner, S. (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiological reviews.* **76** (3) 651-685.
- Jarai, G. y F. Buxton (1994) Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Curr.Genetics* **26**:238-244.
- Johnstone, I. L. (1985) Transformation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.Sci.* **2** (10):307-311.
- Kaffman, A., N. M. Rank, E. M. O'Neill, L. S. Huang y E. K. O'Shea (1998) The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396** (6710):482-486.
- Kalderon, D. (1997) Hedgehog signalling: Ci complex cuts and clasps. *Current Biology* **7** (12) 759-762.
- Katz, M.E., Rice, R.N. y Cheetham, B.F. (1994) Isolation and characterisation of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease, *Gene* **150**, 287-292.
- Keller, N.P., Nesbit, C., Sarr, B., Phillips, T.D. y Burow, G.B. (1997) pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathol.* **87**: 643-648.
- Kidd, S. (1992) Characterization of the *Drosophila cactus* locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* **71**: 623-635.
- Kieran, M., V. Blank, F. Logeat, J. Vandekerckhove, F. Lottspeich, O. Le Bail, M. B. Urban, P. Kourilsky, P. A. Baeuerle, y A. Israel (1990) The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* **62**:1007-1018.
- Kimble, J. y P. Simpson (1997) The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu.Rev.Cell Dev Biol.* **13**:333-61.
- Klug, A. y D. Rhodes. (1987) 'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem Sci* **12**:464-469,.
- Kopp, E. y Ghos., S. (1995) NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58**: 1-27.
- Kulmburg, P., M. Mathieu, C. Dowzer, J. Kelly y B. Felenbok (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Microbiol.* **7**:847-857.
- Kutay, U., F. R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft y D. Gorlich (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90** (6):1061-1071.
- Kyuhyung, H. y Manley, J.L. (1993) Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO. J.* **12** (7) 2723-2733.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259):680-685.

BIBLIOGRAFÍA

- Lambert, M., S. Blanchin-Roland, F. Le Louedec, A. Lépingle, y C. Gaillardin (1997).** Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a *RIM101/pacC* homolog. *Mol Cell Biol* **17**:3966-3976.
- Leong, S. A. y Holden, D. W.(1989)** Molecular genetic approaches to the study of fungal pathogenesis. *Ann rev. Phytopathol.* **27**: 463-481.
- Li, W. S. y A. P. Mitchell. (1997)** Proteolytic activation of rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**(1):63-73.
- Li, X., W. Shou, M. Kloc, B. A. Reddy y L. D. Etkin (1994)** Cytoplasmic retention of *Xenopus* nuclear factor 7 before the mid blastula transition uses a unique anchoring mechanism involving a retention domain and several phosphorylation sites. *J.Cell Biol.* **124** (1-2):7-17.
- Licht, J. D., W. Hanna-Rose, J. C. Reddy, M. A. English, M. Ro, M. Grosseil, R. Shaknovich, and U. Hansen (1994)** Mapping and mutagenesis of the amino-terminal transcriptional repression domain of the *Drosophila* Kruppel protein. *Mol.Cell Biol.* **14** (6):4057-4066.
- Lin, L. y S. Ghosh (1996)** A glycine-rich region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol.Cell Biol.* **16**:2248-2254.
- Lin, L., DeMartino, G.N. y Greene, W. C. (1998)** Cotranslational biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**: 819-828.
- Lockington, R. A., H. M. Sealy-Lewis, C. Scazzocchio y R. W. Davis (1985)** Cloning and characterisation of the ethanol utilisation regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **33**:137-149.
- Lockington, R., C. Scazzocchio, D. Sequeval, M. Mathieu y B. Felenbok (1987)** Regulation of *alcR*, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*. *Mol.Microbiol.* **1** (3):275-281.
- Maccheroni, W., G. S. May, N. M. Martinezrossi, y A. Rossi (1997)** The sequence of *palf*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**(2):163-167.
- Matheny, C., M. L. Day y J. Milbrandt (1994)** The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J.Biol.Chem.* **269** (11):8176-8181.
- Mathieu, M. y B. Felenbok (1994).** The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR specific transactivator. *EMBO J.* **13**:4022-4027.
- Mattaj, I. W. y L. Englmeier (1998).** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:265-306.
- Maurer, K.C.T., Urbanus, J.H.M. y Planta, R.J. (1995)** Sequence analysis of a 30 kb DNA segment from yeast chromosome XIV carrying a ribosomal protein gene cluster, the genes encoding a plasma membrane protein and a subunit of replication factor C, and a novel putative serine/threonine protein kinase gene. *Yeast* **11**: 1303-1310.
- Maxam, A. M. y W. Gilbert (1980)** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65** (1):499-560.
- McCabe, A. P., J. P. T. W. Vandenhomborgh, J. Tilburn, H. N. Arst, y J. Visser (1996).** Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*; a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol Gen Genet* **250**(3):367-374.
- McCabe, A.P., Orejas, M., Pérez-González, J.A. y Ramón D. (1998)** Opposite patterns of expression or two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J. Bacteriol* **180**: 1331-1333.

- McCully, K. S. y Forbes, E. (1965)** The use of master strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genet. Res.* **6**: 352-359.
- Melchior, F., B. Paschal, J. Evans y L. Gerace (1993)** Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123** (6 Pt 2):1649-1659.
- Méthot, N. y Basler, K. (1999)** Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*. *Cell*, **96**: 819-831.
- Michaud, N. y D. S. Goldfarb (1991)** Multiple pathways in nuclear transport: the import of U2 snRNP occurs by a novel kinetic pathway. *J. Cell Biol.* **112** (2):215-223.
- Mingot., J. M., J. Tilburn, E. Díez, E. Bignell, M. Orejas, D. A. Widdick, S. Sarkar, C. V. Brown, M. X. Caddick, E. A. Espeso, H. N. Jr Arst y M. A. Peñalva (1999)** Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell Biol.* **19** (2):1390-1400.
- Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch y K. Nasmyth (1991)** The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle- regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* **66** (4):743-758.
- Mooney, J. L. y Yager, L.N. (1990)** Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**: 1473-1482.
- Moore, M. S. y G. Blobel (1993)** The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365** (6447):661-663.
- Morisato, D. y K. V. Anderson (1995)** Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genet.* **29**:371-399.
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Díez, E., Denison, S.H., Tilburn, J., Espeso, E.A., Peñalva, M.A. y Arst, H.N., Jr. (1999)** Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene Characterization. *Mol Microbiol.* En publicación.
- Negrete-Urtasun, S., S. N. Denison y H. N. Jr Arst (1997)** Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* **179**(5):1832-1835.
- Nickas, M. E., y M. P. Yaffe. (1996)** BRO1, a novel gene that interacts with components of the PKC1-MAP kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**:2585-2593.
- Nigg, E. A. (1997)** Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386** (6627):779-787.
- Nose, A., Mahajan, V.B. y Goodman, C.S. (1992)** Connectin: a homophilic Cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* **70**: 553-567.
- Ohtsubo, M., H. Okazaki y T. Nishimoto (1989)** The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J. Cell Biol.* **109** (4 Pt 1):1389-1397.
- Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst, Jr., y M. A. Peñalva (1995).** Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**:1622-1632.
- Oshima, Y. (1997)** The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **72** (6):323-334.

BIBLIOGRAFÍA

- Palacios I., K. Weis, C. Klebe, I. W. Mattaj y C. Dingwall (1996)** RAN/TC4 mutants identify a common requirement for snRNP and protein import into the nucleus. *J. Cell Biol.* **133** (3):485-494.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg, y T. Maniatis (1994)**. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappaB1 precursor protein and the activation of NF-kappaB. *Cell* **78**:773-785.
- Panozzo, C., V. Capuano, S. Fillinger y B. Felenbok (1997)** The zinc binuclear cluster activator AlcR is able to bind to single sites but requires multiple repeated sites for synergistic activation of the *alcA* gene in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **272**(36):22859-22865.
- Pante, N. y U. Aebi (1996)** Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **31** (2):153-199.
- Pavletich, N. P. y C. O. Pabo (1993)**. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* **261**:1701-1707.
- Perez-Esteban, B., M. Orejas, E. Gomez-Pardo y M. A. Penalva (1993)** Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol.Microbiol.* **9** (4):881-895.
- Picard, D., S. J. Salsler, y K. R. Yamamoto (1988)**. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* **54** (7):1073-1080.
- Pollard, V. W., W. M. Michael, S. Nakielny, M. C. Siomi, F. Wang, y G. Dreyfuss (1996)** A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86** (6):985-994.
- Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. Macdonald y A. W. J. Buffon (1953)** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* **5**:141-238.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, D. W., MacDonald, K. D. y Buffon, A. W. (1953)** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**: 141-238.
- Pu, R. T. y S. A. Osmani (1995)** Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* is required for mitotic exit. *EMBO J.* **14** (5):995-1003.
- Punt, P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemans, P. H. Pouwels y C. A. van den Hondel (1987)** Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56** (1):117-124.
- Ramón, D., L. Carramolino, C. Patino, F. Sanchez y M. A. Peñalva (1987)** Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the beta-lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **57** (2-3):171-181.
- Reach, M., Galindo, R.L., Towb, P., Allen, J. L., Karin, M. y Wasserman, A. (1996)** A gradient of Cactus protein degradation establishes dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biology.* **180**: 353-364.
- Reddy, B. A., M. Kloc y L. Etkin (1991)** The cloning and characterization of a maternally expressed novel zinc finger nuclear phosphoprotein (xnf7) in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* **148** (1):107-116.
- Reichelt, R., A. Holzenburg, E. L. Jr Buhle, M. Jarnik, A. Engel, y U. Aebi (1990)**. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* **110** (4):883-894.
- Rexach, M. y G. Blobel (1995)**. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83** (5):683-692.
- Ribbeck, K., G. Lipowsky, H. M. Kent, M. Stewart y D. Gorlich (1998)** NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* **17** (22):6587-6598.

- Richards, S. A., K. M. Lounsbury y I. G. Macara (1995)** The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *J.Biol.Chem.* **270** (24):14405-14411.
- Richards, S. A., K. M. Lounsbury, K. L. Carey y I. G. Macara (1996)** A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. *J.Cell Biol.* **134** (5):1157-1168.
- Rossi, A. y Arst, H. N. Jr. (1990)** Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Letters* **66**: 947-952.
- Rout, M. P. y G. Blobel (1993)** Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J.Cell Biol.* **123** (4):771-783.
- Ruiz i Altaba, A. (1997)** Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* **90**:193-196.
- Sakai, J., E. A. Duncan, R. B. Rawson, X. Hua, R. S. Brown, y J. L. Goldstein (1996)** Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* **85**(7):1037-1046.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, S., Caddick, M.X., Bignell, E., Tilburn, J. y Arst, H.N., Jr. (1996)** Regulation of gene expression by ambient pH in *Aspergillus*: genes expressed at acid pH. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 360-363.
- Sato, R., J. Yang, X. Wang, M. J. Evans, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, y M. S. Brown (1994)** Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J.Biol.Chem.* **269**:17267-17273.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T. y Ballard, D.W. (1995)** signal-induced degradation of I κ B α requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11259-11263.
- Schlenstedt, G. (1996)** Protein import into the nucleus. *FEBS Lett.* **389** (1):75-79.
- Schneider, K. R., R. L. Smith y E. K. O'Shea (1994)** Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266** (5182):122-126.
- Schreiber, V., M. Molinete, H. Boeuf, G. de Murcia y J. Menissier-de Murcia (1992)** The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* **11** (9):3263-3269.
- Seeburg, P. H., W. W. Colby, D. J. Capon, D. V. Goeddel y A. D. Levinson (1984)** Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* **312**:71-75.
- Shah, A. J., J. Tilburn, M. W. Adlard, y H. N. Arst, Jr. (1991)** pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol.Lett.* **77**:209-212.
- Shields, J. M. y V. W. Yang (1997)** Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *J.Biol.Chem.* **272** (29):18504-18507.
- Silver, P. A., R. Brent y M. Ptashne (1986)** DNA binding is not sufficient for nuclear localization of regulatory proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **6** (12):4763-4766.
- Siomi, H. y G. Dreyfuss (1995)**. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J.Cell Biol.* **129** (3):551-560.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, y K. Suzuki (1997)**. Structure and physiological functions of calpains.

BIBLIOGRAFÍA

Biochem.J. **328**:721-732.

- Southern, E. M (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98** (3):503-517.
- Strauss, E. C., J. A. Koberi, G. Siu y L. E. Hood (1986)**. Specific-primer-directed DNA sequencing. *Anal.Biochem.* **154** (1):353-360.
- Su, S. Y. S. y A. P. Mitchell (1993)**. Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic.Acids.Res.* **21**:3789-3797.
- Suárez T. y M. A. Peñalva (1996)** Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol.Microbiol.* **20**:529-540.
- Suelmann, R., N. Sievers y R. Fischer (1997)**. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Microbiol.* **25** (4):757-769.
- Suelmann, R., N. Sievers, D. Galetzka, L. Robertson, W. E. Timberlake y R. Fischer (1998)** Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *Aspergillus nidulans*: molecular characterization of *apsB* and in vivo observation of nuclear behaviour. *Mol.Microbiol.* **30** (4):831-842.
- Suzuki, M. (1989)** SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **207**, 61-84.
- Thanos, D. y T. Maniatis (1995)** NF-kappaB: a lesson of family values. *Cell* **24**:529-532.
- Thom, C. y Raper, K. B. (1945)** A manual of the *Aspergilli*. Bailliére Tindall y Cox (eds). London.
- Thomas, P. S. (1980)** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77** (9):5201-5205.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington y R. W. Davies (1983)** Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**:205-211.
- Tilburn, J., Sarkar, S., widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A. y Arst, H.N., Jr. (1995)** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**: 779-790.
- Timberlake, W. E. (1990)** Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann. Rev. Gen.* **24**: 5-36.
- Timberlake, W. E. y Marshall, M. A. (1988)** Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **4**: 162-169.
- Timberlake, W. E. y Marshall, M. A. (1989)** Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**: 1313-1317.
- Timberlake, W.E. y Clutterbuck, A.J. (1994)** Genetic regulation of conidiation. In *Aspergillus: 50 years on*. Martinelli, S.S. y Kinghorn, J.R. (eds). Elsevier Science, Amsterdam, The Neatherlands.
- Tjian, R. y Maniatis, T. (1994)** Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, **77**, 5-8.
- Traenckner, E. B. M., H. L. Pahl, T. Henkel, K. N. Schmidt, S. Wilk, y P. A. Baeuerle (1995)** Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**:2876-2883.
- Tsien, R. Y. (1998)** The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:509-44:509-544.
- Tzamarias, D. y K. Struhl (1993)** Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369** (6483):758-761.

- Upshall, A., Giddings, B. y Mortimore, I.D. (1977)** The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 413-418.
- Valent., B. y Chumley., F.G. (1991)** Molecular genetics analysis of the of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **29**:443-467.
- van den Hombergh, J. P. T. W., A. P. MacCabe, P. J. I. Vandevondervoort, y J. Visser (1996)** Regulation of acid phosphatases in an *Aspergillus niger pacC* disruption strain. *Mol Gen Genet* **251**(5):542-550.
- van Gorcom, R. F. M., P. J. Punt, P. H. Pouwels y C. A. M. J. J. van den Hondel (1986)** A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene* **48**:211-217.
- van Heeswijck, R. y M. J. Hynes (1991)**. The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possibly overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans amdS* gene. *Nucleic.Acids.Res.* **19**:2655-2660.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. y Miyamoto, S. (1995)** Rel/ NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**: 2723-2735.
- Von Ohlen, T. y Hooper, J.E. (1997)** Hedgehog signaling regulates transcription through Gli/Ci binding sites in the *wingless* enhancer. *Mech. Dev.* **68**, 149-156.
- Von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R. y Hooper, J. (1997)** Hedgehog signaling regulates transcription through *cubitus interruptus*, a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2404-2409.
- Wang, X., R. Sato, M. S. Brown, X. Hua y J. L. Goldstein (1994)** SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**:53-62.
- Waring, R. B., G. S. May y N. R. Morris (1989)** Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**:119-130.
- Whiteside S.T., Ernst, M.K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N. e Israel, A. (1995)** N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/ I κ B α in response to inducers of NF- κ B activity. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5339-45.
- Wilson, R. B., D. Davis, y A. P. Mitchell (1999)** Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* **181**:1868-1874.
- Yelton, M. M., J. E. Hamer y W. E. Timberlake (1984)** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81** (5):1470-1474.
- Yokoyama, C., Wang, S., Briggs, M.r., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1993)** SEBP-1 a basic helix-loop-helix leucine Zipper protein that controls transcription of the LDL receptor gene. *Cell* **75**, 187-197.
- Zhu, J. y F. McKeon (1999)** NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* **398** (6724):256-260.

PUBLICACIONES

A continuación se incluyen los artículos en los que se encuentra publicado parte del trabajo de esta tesis¹, así como trabajo relacionado con el sistema regulador de pH en *A. nidulans*² o con técnicas de genética formal y molecular empleadas en esta tesis³.

1. **J. M. Mingot**, J. Tilburn, E. Diez, E. Bignell, M. Orejas, D. A. Widdick, S. Sarkar, C. V. Brown, M. X. Caddick, E. A. Espeso, H. N. Jr Arst, and M. A. Penalva (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell Biol.* 19 (2):1390-1400.
2. S. H. Denison, S. Negrete-Urtasun, **J. M. Mingot**, J. Tilburn, W. A. Mayer, A. Goel, E. A. Espeso, M. A. Penalva, and H. N. Jr Arst (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30 (2):259-264.
3. **J. M. Mingot**, M. A. Penalva, and J. M. Fernandez-Canon (1999) Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J. Biol. Chem.* 274 (21):14545-14550.

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

JOSÉ-MANUEL MINGOT,¹ JOAN TILBURN,² ELIECER DIEZ,¹ ELAINE BIGNELL,² MARGARITA OREJAS,^{1†} DAVID A. WIDDICK,^{2‡} SOVAN SARKAR,^{2§} CHRISTOPHER V. BROWN,² MARK X. CADDICK,^{2||} EDUARDO A. ESPESO,^{1#} HERBERT N. ARST, JR.,² AND MIGUEL A. PEÑALVA^{1*}

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, Madrid 28006, Spain,¹ and Department of Infectious Diseases, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, United Kingdom²

Received 14 September 1998/Returned for modification 13 October 1998/Accepted 2 November 1998

The *Aspergillus nidulans* transcription factor PacC, which mediates pH regulation, is proteolytically processed to a functional form in response to ambient alkaline pH. The full-length PacC form is unstable in the presence of an operational pH signal transduction pathway, due to processing to the relatively stable short functional form. We have characterized and used an extensive collection of *pacC* mutations, including a novel class of "neutrality-mimicking" *pacC* mutations having aspects of both acidity- and alkalinity-mimicking phenotypes, to investigate a number of important features of PacC processing. Analysis of mutant proteins lacking the major translation initiation residue or truncated at various distances from the C terminus showed that PacC processing does not remove N-terminal residues, indicated that processing yields slightly heterogeneous products, and delimited the most upstream processing site to residues ~252 to 254. Faithful processing of three mutant proteins having deletions of a region including the predicted processing site(s) and of a fourth having 55 frameshifted residues following residue 238 indicated that specificity determinants reside at sequences or structural features located upstream of residue 235. Thus, the PacC protease cuts a peptide bond(s) remote from these determinants, possibly thereby resembling type I endonucleases. Downstream of the cleavage site, residues 407 to 678 are not essential for processing, but truncation at or before residue 333 largely prevents it. Ambient pH apparently regulates the accessibility of PacC to proteolytic processing. Alkalinity-mimicking mutations L259R, L266F, and L340S favor the protease-accessible conformation, whereas a protein with residues 465 to 540 deleted retains a protease-inaccessible conformation, leading to acidity mimicry. Finally, not only does processing constitute a crucial form of modulation for PacC, but there is evidence for its conservation during fungal evolution. Transgenic expression of a truncated PacC protein, which was processed in a pH-independent manner, showed that appropriate processing can occur in *Saccharomyces cerevisiae*.

A growing class of transcription factors is activated by the proteolytic removal of protein domains which negatively modulate their activity. These negatively acting domains can be provided in *trans* (i.e., by another protein in a complex) or in *cis* (i.e., by a region within the transcription factor's primary translation product). Examples of the former are the p50-p52 NF- κ B family and their negative regulators, the I κ B proteins,

which regulate human genes involved in immune and inflammatory responses (reviewed in reference 37), and their respective *Drosophila* homologues *dorsal* and *cactus* (reviewed in reference 3), which establish the dorsal-ventral polarity of the fly embryo and mediate the *Drosophila* immune response (19). Examples of the latter include the p105 precursor of NF- κ B p50 (whose C-terminal moiety is homologous to a *trans*-acting member of the I κ B family); the sterol regulatory element binding proteins (reviewed in reference 5), which activate genes for cholesterol biosynthesis, low density lipoprotein receptors, and fatty acid synthesis; the zinc finger protein Ci, which is the product of the *Drosophila cubitus interruptus* gene, a mediator of the Hedgehog signal (reviewed in reference 30); and the *Aspergillus nidulans* zinc finger protein PacC, which mediates regulation of gene expression by ambient pH (39). An extensive collection of *pacC* mutations, including acidity-mimicking *pacC*^{+/-} loss-of-function mutations, alkalinity-mimicking *pacC*^c gain-of-function mutations, and neutrality-mimicking *pacC*^{cl} mutations (references 6 and 39 and this work) is available, making PacC a particularly well-suited choice for investigating the proteolytic activation of eukaryotic transcription factors.

In the current model (25), the 678-residue primary transla-

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, Velázquez 144, Madrid 28006, Spain. Phone: 34 91 5611800. Fax: 34 91 5627518. E-mail: cibp173@fresno.csic.es.

† Present address: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos CSIC, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

‡ Present address: Department of Genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom.

§ Present address: School of Biosciences, University of Westminster, London W1M 8JS, United Kingdom.

|| Present address: School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZD, United Kingdom.

Present address: Department of Infectious Diseases, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, United Kingdom.

TABLE 1. *pacC* mutations used in this work

| Mutation | Parental strain genotype | Mutagen | Selection method | Reference |
|--|---|------------------|--|-----------|
| <i>pacC504</i> | <i>pabaA1 pacC^{c5}</i> | NQO ^a | Growth on 50 mM GABA ^b as C and N sources | 39 |
| <i>pacC^{+/-}7604</i> | <i>inoB2 pacC^{c76}</i> | UV | Resistance to neomycin (2 mg/ml) | 39 |
| <i>pacC^{+/-}508 and 515</i> | <i>pabaA1 pacC^{c5}</i> | UV | Resistance to neomycin (200 µg/ml) + 0.04% sodium deoxycholate | 39 |
| <i>pacC^{+/-}230</i> | <i>areA⁺ inoB2 fwA1</i> | UV | Growth on 5 mM GABA as N source | This work |
| <i>pacC^{c20000}</i> | <i>yA2 gatA2 pantoB100 pacC^{c200}</i> | UV | Resistance to neomycin (1 mg/ml) | This work |
| <i>pacC^{c63} and 69</i> | <i>pabaA1 yA2 wA3 palA1</i> | UV | Growth at pH 8 | This work |
| <i>pacC^{+/-}206</i> | <i>biA1 areA1601 areA⁺ 168 pantoB100</i> | UV | Growth on 5 mM GABA as N source | This work |
| <i>pacC^{c-}20601, 20602, and 20604</i> | <i>pacC^{+/-}206 pantoB100</i> | UV | Growth at pH 8 | This work |
| <i>pacC^{c20603}</i> | <i>pacC^{+/-}206 pantoB100</i> | UV | Growth at pH 8 | This work |
| <i>pacC^{c39}</i> | <i>biA1 pyroA4 palB7 chaA1</i> | NQO | Growth at pH 8 at 42°C | This work |
| <i>pacC^{c50}</i> | <i>biA1 nis-5</i> | UV | Enhanced growth on nitrite as N source + 40 mM CsCl | 29 |
| <i>pacC^{c2020503} and -2020508 (2020516, 2020515)</i> | <i>pabaA1 pacC^{+/-}20205 pacC^{c202}</i> | UV | Growth at pH 8 | This work |
| <i>pacC^{c67} and 75</i> | <i>inoB2 palB7 chaA1</i> | UV | Growth at pH 8 | This work |
| <i>pacC^{c202}</i> | <i>pabaA1 sasA60</i> | Spontaneous | Resistance to GABA toxicity | 39 |
| <i>pacC^{+/-}20205</i> | <i>pacC^{c202}</i> | UV | Resistance to neomycin (1 mg/ml) | This work |
| <i>pacC^{c14}</i> | <i>pabaA1 gatA2 palF15 fwA1</i> | UV | Resistance to 5 mM GABA in presence of 10 mM ammonium tartrate as N source | 39 |
| <i>pacC^{c5}</i> | <i>biA1</i> | UV | Decreased staining for acid phosphatase | 11 |

^a NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide.

^b GABA, α-aminobutyrate.

tion form of PacC is activated at alkaline ambient pH by proteolytic removal of a C-terminal negatively acting domain. The resulting truncated PacC form activates transcription of genes expressed at alkaline pH through 5'-GCCARG sites in their promoters (12, 14) and prevents expression of acid-expressed genes (22, 31). PacC processing is triggered by a signal transduced by the *pal* gene pathway under alkaline growth conditions, resulting in an as-yet-unknown modification of the protein. This causes a conformational change in PacC, rendering it accessible to proteolytic removal of more than 400 C-terminal residues, including the negatively acting domain.

Here we address several important aspects of this model, demonstrating a precursor-to-product relationship between the two PacC forms, an obligatory requirement for a functional *pal* signalling pathway for proteolytic processing, and the integrity of the original N terminus in the processed form. We describe single-residue substitutions that almost certainly disrupt interactions between the N- and C-terminal moieties of PacC, resembling C-terminal truncations of PacC in their alkalinity mimicry and constitutive processing (25, 39). An acidity-mimicking deletion likely to prevent pH signal reception or its effect prevents processing. We determine that the most upstream site(s) of processing is within residues 252 to 254 or in the immediate vicinity and show that the specificity for processing resides upstream of residue 235 and thus upstream of the cleavage site(s). Finally, we show that this unusual processing reaction can occur in *Saccharomyces cerevisiae*, provided that the pH signalling pathway is bypassed.

MATERIALS AND METHODS

A. nidulans strains, phenotype testing, and genetic analysis. All strains used in this work carried markers in standard use (7). Standard media, phenotype testing, and genetic procedures were used (references 1, 6, 7, and 39 and references therein). Penicillin production broth (PPB) is appropriately supplemented minimal medium (8) containing 2.5% (wt/vol) corn steep liquor, 10 mM ammonium tartrate, and the indicated carbon sources. Media were adjusted to acidic, neutral, or alkaline pH as described previously (25). For classical mutant strains, 3% (wt/vol) sucrose was present. For strains carrying gene fusions to *alcA^P*, media (adjusted to acidic pH) contained (final concentrations) 100 mM L-threonine and

0.05% glucose for inducing conditions and 3% glucose for noninducing, repressing conditions. In all cases, except those for transient-expression experiments, cultures were grown for 24 h at 37°C.

Isolation and characterization of new *pacC* mutations. The parental strains and selection procedures used to isolate the classical *pacC* mutations used in this work are shown in Table 1. Their approximate positions are shown in Fig. 1. New mutations were characterized by sequencing as described previously (39). Strains carrying these mutations also carried one or more additional markers which do not affect pH regulation.

EMSA and protein extraction. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and protein extraction were done as described previously (25). EMSA mixtures were made with 0.3 ng (~20,000 Cerenkov cpm) of the ³²P-labelled 31-mer double-stranded oligonucleotide containing the high-affinity *ipnA2* PacC binding site (12, 14, 39). Protein-DNA complexes were usually resolved in 4% polyacrylamide gels, but 8% polyacrylamide gels and longer runs were used for high resolution of complexes corresponding to proteins approximating the size of the processed form.

Western analysis. Proteins (100 µg) were resolved in a sodium dodecyl sulfate (SDS)-11% polyacrylamide gel and were analyzed by Western blotting as described previously (25). The primary antibody (working dilution, 1:2,000) was a polyclonal antiserum raised in rats against a His-tagged PacC(5-265) protein, which was overexpressed in *Escherichia coli* and purified by Ni²⁺ affinity chromatography. The protein was denatured in a buffer containing 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol before immunization of the animals. The secondary antibody was a peroxidase-conjugated sheep anti-rat antibody (working dilution, 1:2,000). Peroxidase activity was detected with the ECL system (Amersham).

Plasmids. pALC (15) was used for expression of PacC wild-type and mutant proteins under *alcA^P* control. This plasmid contains a functional *alcA^P* promoter including a transcription start site separated from a downstream *trpC* transcription terminator by a 5'-*Sall-XbaI-BamHI-SmaI-PstI-EcoRI*-3' polylinker region. Two versions of this vector, carrying as a selection marker either an *argB⁺* allele or a frameshifted (*BglII* blunt-ended) *argB* allele (to select for integration in the *argB* locus), were used. Constructs derived from pALC are described in Table 2. Constructs driving expression of PacC proteins in yeast under the control of *GAL1^P* were derivatives of Invitrogen pYES2 (see also Table 2). p[*alcA^P::PacC(5-678)*] was constructed by subcloning a cDNA fragment containing the complete *pacC* coding region into pALC. This fragment was flanked by an *NcoI* site (converted to a *BamHI* site) and a second *BamHI* site. The *NcoI* site overlapped the Met5 codon. The 3' *BamHI* site is located 90 bp downstream of the translation stop codon. p[*alcA^P::PacC(5-265)*] was made by subcloning an *NcoI-BstEII* fragment (both cohesive ends blunted with Klenow) into the *SmaI* site of pGEX-2T (Pharmacia) to introduce *BamHI* (5') and *EcoRI* (3') flanking sites, which were used for subcloning into pALC. For construction of pPacΔ1, a cDNA encoding an internally deleted PacC protein lacking residues 235 to 264 was reconstructed by ligating a *BamHI-AccI* fragment (filled in with Klenow) from the above-described pGEX-2T derivative with a *BstEII-EcoRI* fragment (filled in with Klenow) from the pJB2 (39) cDNA clone into pGEX-2T digested

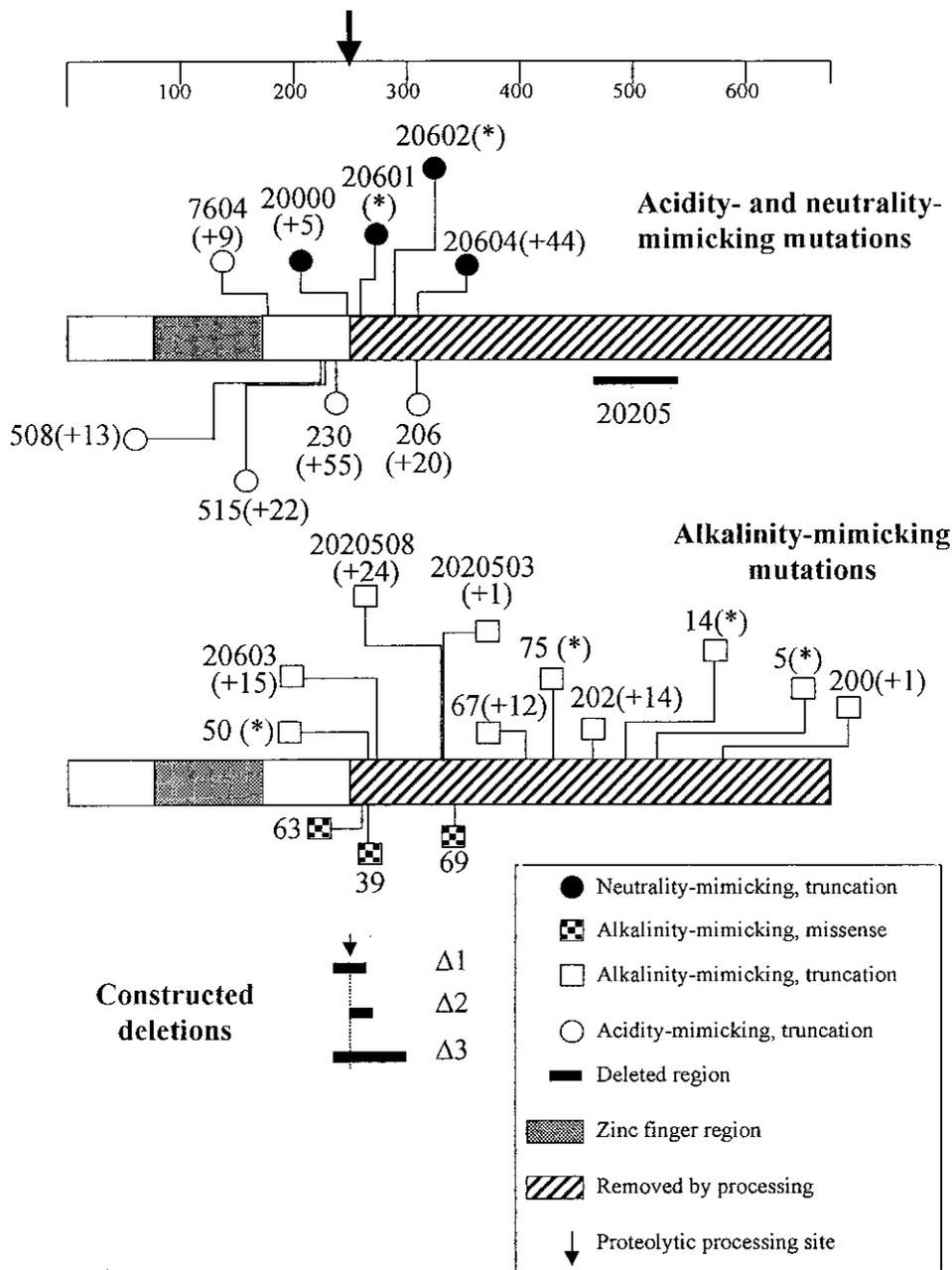


FIG. 1. Positions of *pacC* mutations used in this work. The two bar diagrams represent the *PacC* coding sequence, with the scale at the top indicating amino acid residues. The ends of normal sequence before truncating mutations, the positions of missense mutations, and the extents of deletions are shown. Allele numbers for classical mutations are given. Their molecular descriptions are detailed in Table 3. Within parentheses is the number of additional residues added by frameshift mutations. Asterisks indicate nonsense mutations. Recombinant alleles $\Delta 1$, $\Delta 2$, and $\Delta 3$ are described in Table 2.

with *Bam*HI and *Eco*RI. The deleted cDNA open reading frame was then subcloned as a *Bam*HI fragment (note the presence of a second *Bam*HI site 3' to the translation stop codon) into pALC. Plasmid p*PacC* $\Delta 2$ was made by PCR amplification and in-frame rejoining of two fragments encoding residues 5 to 250 and 271 to 678, respectively. p*PacC* $\Delta 3$ was constructed by ligating a *Bam*HI-*Acc*I fragment (filled in with Klenow) and an *Ava*I-*Eco*RI fragment (filled with Klenow) in pALC digested with *Bam*HI and *Eco*RI. pYES::PacC(5-265) was made by subcloning a 0.8-kb *Bam*HI-*Eco*RI fragment from p[*alcA*⁺::PacC(5-678)] in pYES2. Plasmid pYES::PacC(5-678) was made by subcloning the *Bam*HI fragment containing the complete wild-type *pacC* open reading frame in pYES2. Plasmid pYES::PacC(5-492) was constructed by introducing the *pacC*¹⁴ nonsense mutation in *pacC* codon 493 of pYES::PacC(5-678). Correct in-frame joining of fragments and the absence of PCR-introduced mutations in *pacC* mutant versions were verified by automated DNA sequencing.

***A. nidulans* transformation.** Constructs were introduced into Δ *pacC* (full genotype, *biA1 pabaA1 yA2 pyrG89 argB2 Δ pacC::pyr4⁺*) and *palA1 Δ pacC* (full genotype, *yA2 argB2 palA1 Δ pacC::pyr4⁺ pantoB100*) recipient strains as appropriate (39, 40). Homokaryotic transformed clones were purified by repeated streaking on selective medium lacking arginine and analyzed by Southern blot hybridization. Two independent clones carrying a single-copy integration were chosen for each transforming construct and were shown to have the same phenotype.

Transient-expression experiments. Acidic PPB cultures containing 3% (wt/vol) glucose were inoculated with 2×10^6 conidiospores/ml and incubated for 14 h at 37°C with vigorous shaking. Mycelia were harvested, washed with sterile water, and transferred to fresh acidic PPB containing 0.05% (wt/vol) glucose (a derepressing concentration) and 100 mM L-threonine (a strong inducer of *alcA*^P), in which they were incubated for a further 6 h at 37°C. After this time, 3%

TABLE 2. Plasmids encoding wild-type and mutant versions of PacC

| Construct name | Encoded PacC product | Host |
|---|----------------------------------|----------------------|
| p[<i>alcA</i> ^P :: <i>PacC</i> (5-678)] | 5-678 | <i>A. nidulans</i> |
| p[<i>alcA</i> ^P :: <i>PacC</i> (5-265)] | 5-265+GNSS | <i>A. nidulans</i> |
| p <i>PacC</i> Δ1 | (5-234)+C::(265-278) | <i>A. nidulans</i> |
| p <i>PacC</i> Δ2 | (5-250)::(271-678) | <i>A. nidulans</i> |
| p <i>PacC</i> Δ3 | (5-234)+S::(301-678) | <i>A. nidulans</i> |
| pYES::PacC(5-265) | 5-265+GNSADIHHTG GRSSMHLEGRIM | <i>S. cerevisiae</i> |
| pYES::PacC(5-678) | 5-678 | <i>S. cerevisiae</i> |
| pYES::PacC(5-492) | 5-492 | <i>S. cerevisiae</i> |

(wt/vol) glucose was added to the cultures to repress *alcA*^P transcription, and samples were taken at different time points (see Fig. 1 legend) after restoration of glucose repressing conditions. Mycelial samples were also taken immediately before and after promoter induction. Control transfer experiments showed that under such conditions 3% glucose prevented threonine induction of *alcA*^P. Protein extracts were prepared from samples (2 to 4 g [wet weight] of mycelium) as described previously (25).

Yeast methods. Standard methods were used for growth and maintenance of *S. cerevisiae* strains (33). W303-1A (38) (*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-52 trp1-1*, obtained from J. M. Gancedo) was used as the recipient for transformation by the lithium acetate procedure (17). For expression of PacC protein derivatives, cells were pregrown overnight at 30°C in 2% glucose minimal medium (lacking uracil). These primary cultures were used to inoculate secondary cultures in 2% raffinose minimal medium (lacking uracil), which were grown to an optical density at 600 nm of 0.6. At this point, 2% (wt/vol) D-galactose was added to induce the *GAL1* promoter, and the cultures were further incubated for 6 h. Cells (20 ml) were collected by centrifugation, washed with water, and resuspended in twice their cell volume of lysis buffer (25 mM HEPES [pH 7.5], 50 mM KCl, 0.4 M ammonium sulfate, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μM leupeptin, and 0.6 μM pepstatin). Next, 1 to 1.5 volumes of glass beads (0.5-mm diameter) were added, and cells were lysed after vigorous vortexing (five times for 1 min each). The supernatants were decanted and collected, and glass beads and debris were washed with 0.4 ml of lysis buffer. Both supernatants were combined and centrifuged at 4°C for 60 min at 14,000 rpm in an Eppendorf microcentrifuge. The cleared supernatants (usually containing 2 mg of protein per ml) were dialyzed against lysis buffer without ammonium sulfate and assayed for PacC binding activity by EMSA, as described above, with 5 μg of protein per assay.

RESULTS

The unstable, full-length PacC form is processed to the relatively stable, short, functional form in the presence of an operational *pal* pathway. To establish a precursor-to-product relationship between the full-length and processed forms of PacC, we used transient-expression experiments, based on conditional expression (threonine inducible and glucose repressible) of proteins under the control of the *alcA* (alcohol dehydrogenase) promoter (28). An *alcA*^P::*PacC*(5-678) construct driving expression of the full-length protein (see below) or an *alcA*^P::*PacC*(5-265) construct driving expression of a truncated protein approximating the processed PacC version was introduced by transformation into a *pacC* null mutant background and targeted in single copy to the *argB* locus by homologous recombination. Neither PacC form was detectable by EMSA in protein extracts from mycelia grown under repressing conditions (Fig. 2A and B, lanes 2). Subsequent promoter induction for 6 h (after mycelial transfer) resulted in the synthesis of PacC proteins (Fig. 2A and B, lanes 3). The fate of the PacC proteins was then analyzed after the *alcA* promoter was switched off by addition of a repressing final concentration (3%, wt/vol) of glucose. The full-length form of PacC (low-mobility complex in Fig. 2) predominated after 6 h of induction of *alcA*^P::*PacC*(5-678) (note that acidic growth conditions were used to reduce its processing), although some processed form (higher-mobility complex) was clearly visible at this point. The

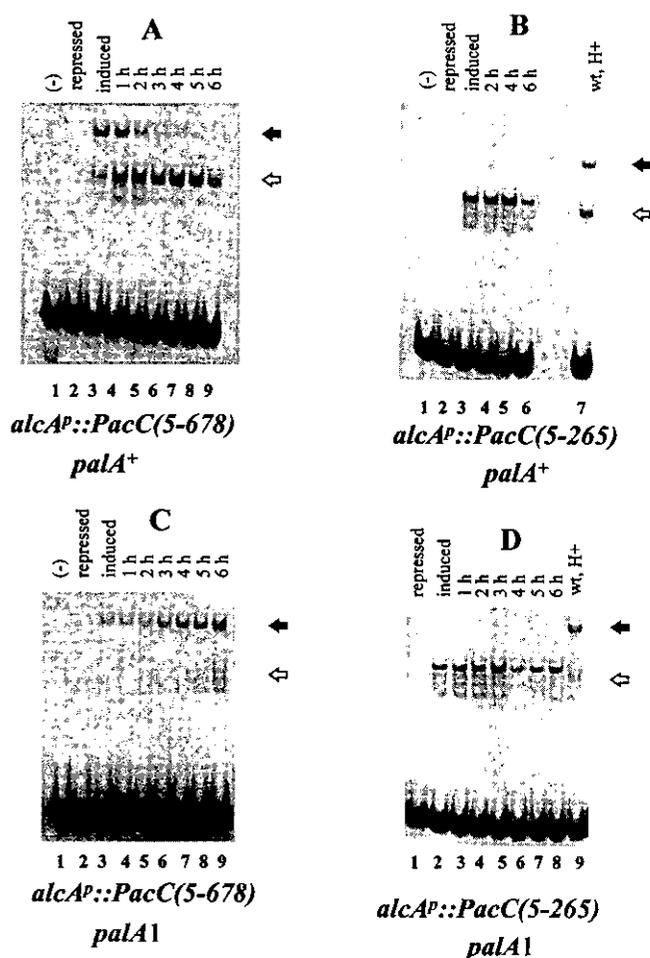


FIG. 2. Transient-expression experiments with PacC(5-265) and PacC(5-678) proteins in the indicated genetic backgrounds. *alcA*^P::*PacC*(5-678) and *alcA*^P::*PacC*(5-265) constructs were transformed into Δ*pacC* and *palA1* Δ*pacC* strains, and transformants having single-copy integrations of the transforming plasmids into the *argB* locus were identified by Southern analysis. Mycelia of the recombinant strains were grown for 14 h under repressing conditions and transferred to fresh acidic medium, with induction for *alcA*^P, in which they were incubated for a further 6 h. After this time, a repressing concentration of glucose was added to prevent expression of the chimeric genes, and mycelial samples were harvested at the indicated time points after glucose repressing conditions were restored. Mycelial samples were also taken before (lanes labelled repressed) and after (lanes labelled induced) the 6-h induction period. Mycelial samples were used to prepare protein extracts that were assayed in EMSA experiments with a PacC target probe. Closed and open arrows indicate the protein-DNA complexes corresponding to the full-length and processed PacC forms, respectively. A control showing the complexes formed with a wild-type extract from mycelia grown under acidic conditions is shown in panels B and D. The PacC(5-265) protein used here is slightly larger than the processed PacC form (see text) but is functional in structural gene activation and repression.

full-length form progressively disappeared after promoter shutdown, with less than 50% remaining after 3 h (data not shown). In contrast, the level of the processed form increased, apparently at the expense of the full-length form, not declining until 5 h after promoter shutdown (Fig. 2A). This indicates that, in the presence of a functional *pal* signal transduction pathway, the full-length form of PacC is significantly less stable than the processed form and that this instability results from the proteolytic processing itself. Consistent with a precursor-to-product relationship of the full-length and processed forms, the PacC(5-265) protein is markedly more stable (Fig. 2B). No reduction was evident 4 h after promoter shutdown, whereas

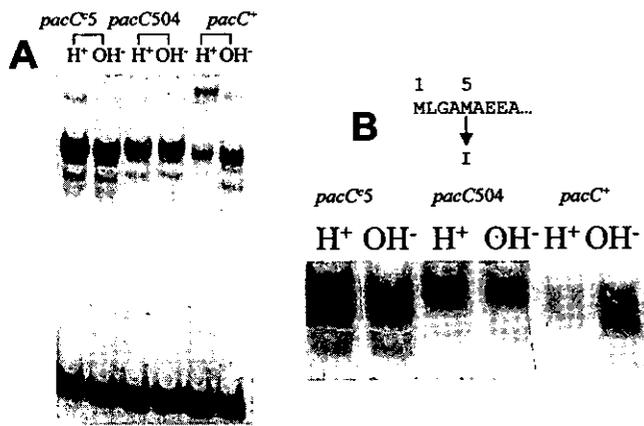


FIG. 3. PacC proteolytic processing does not remove N-terminal residues. (A) EMSA with mycelial extracts of wild-type, *pacC5*, and *pacC504* (*pacC5*) strains. (B) Complexes formed by these extracts were analyzed under conditions maximizing resolution in the region of the processed-form complex. Note the presence of two predominant bands in wild-type and mutant extracts approximately corresponding to a four-residue size difference in the protein moiety, as shown by comparison of the mobilities of the *pacC*⁺ (or *pacC5*) and *pacC504* (*pacC5*) processed-form complexes. Not only the mobility of the protein-DNA complex corresponding to the processed PacC form but also those of the mis-processing or degradation products consistently decrease due to the *pacC504* (*pacC5*) mutation as compared to the *pacC5* single mutant parent. Cultures were grown in PPB for 24 h at 37°C, using 3% sucrose as the main carbon source. In this and all other figures, H⁺ and OH⁻ indicate acidic and alkaline growth conditions, respectively. Note that the *pacC5* strain showed pH-independent elevated PacC levels, in contrast to our previous report (25), in which we detected some pH dependence.

80% of the full-length form had been processed by this time (Fig. 2A) and only a 50% reduction was observed after 6 h. As predicted (25), the *palA1* mutation, preventing pH signal transduction, stabilized the full-length form, blocking processing (Fig. 2C) but not affecting stability of the PacC(5-265) protein (Fig. 2D).

Processing does not involve the N terminus of PacC. We have previously shown that PacC processing involves proteolytic removal of C-terminal residues of PacC (25), but this does not preclude the possibility of additional proteolytic removal of N-terminal residues upstream of the zinc finger region (beginning at residue 76). Two Met codons (codons 1 and 5) are present in the putative *pacC* coding region corresponding to the N terminus, either of which might be used for translational initiation. *pacC504* (39) is a missense mutation affecting codon 5, resulting in an M5I substitution and selected as partially suppressing the alkalinity-mimicking phenotype of *pacC5*. The diminution of this alkalinity-mimicking phenotype by *pacC504* suggested that translational initiation occurs, at least in part, at codon 5 and that suppression results from reduced PacC synthesis (39). *pacC504* does, indeed, reduce PacC levels in a *pacC5* background (Fig. 3A). Figure 3A also shows that the *pacC504* mutation decreases the mobility of the complex formed by the processed form of PacC under both acidic and alkaline growth conditions. High-resolution EMSA analysis (Fig. 3B) confirmed this decreased mobility and showed that the processed PacC complex is resolved into at least two bands, which are seen with both wild-type and *pacC504* extracts, excluding the possibility that they result from alternative translational initiation at Met codons 1 and 5 and suggesting C-terminal heterogeneity of the processed form. These data strongly suggest that Met5 is the major translation initiation residue and that, by mutating codon 5 to an Ile codon, *pacC504* forces the use of Met codon 1 for initiation. Therefore, the

major translation product contains 674 residues (not 678). However, to avoid confusion with the previous literature, we will continue numbering from Met1. In addition, the mobility shift resulting from the *pacC504* mutation demonstrates that processing removes only residues C terminal to the DNA binding domain, leaving the N terminus intact.

Certain alkalinity-mimicking missense mutations facilitate the accessibility of PacC to the processing protease. Sequencing of mutant *pacC* alleles revealed that three alkalinity-mimicking *pacC*^c mutations, *pacC*^{c39}, -63, and -69, are missense mutations resulting in the substitutions L266F, L259R, and L340S, respectively (Table 3). *pacC*^{c39} has a weak and thermosensitive phenotype and is only partially constitutive, as judged by its partial suppression of *palB7* (in contrast to complete suppression by all other characterized *pacC*^c mutations (1, 6). Correlating with the subtle phenotype, PacC processing in a *pacC*^{c39} strain was partially constitutive (i.e., somewhat elevated under acidic growth conditions but more so under alkaline growth conditions) (Fig. 4A). In contrast to the pH-dependent processing seen in the *pacC*^{c39} strain, PacC processing was fully constitutive in strains carrying the phenotypically more extreme *pacC*^{c63} and *pacC*^{c69} mutations (Fig. 4A), thus resembling processing in *pacC*^c strains having a truncated PacC protein (25). The L340S (*pacC*^{c69}) substitution maps at a considerable distance from the processing site (see below) and from the L266F (*pacC*^{c39}) and L259R (*pacC*^{c63}) substitutions. These mutations are therefore unlikely to favor protease recognition, suggesting instead that they modify the accessibility of PacC to the processing protease.

An acidity-mimicking deletion mutation preventing pH signal reception. *pacC*^{+/-20205} is an extreme-acidity-mimicking loss-of-function mutation whose mutant product differs from wild-type PacC mainly through deletion of residues 465 through 540 (Table 3). Phenotypically, *pacC*^{+/-20205} strains closely resemble strains having null mutations in the *palA*, -B, -C, -F, and -H genes (1, 6, 10, 24) of the pH signal transduction pathway. Unlike *pacC* null mutants or strains having mutations such as *pacC*^{+/-206} and *pacC*^{+/-230} (see below), whose low PacC protein levels probably result, at least in part, from instability of the mutant proteins, *pacC*^{+/-20205} strains grow and conidiate normally under acidic and neutral conditions at both 25 and 37°C. The *pacC*^{+/-20205} mutation (Fig. 4B) markedly reduces PacC protein levels in extracts and largely prevents processing under neutral growth conditions (whereas wild-type PacC is nearly fully processed) (note that *pacC*^{+/-20205} strains do not grow under alkaline growth conditions). These data strongly suggest that one or more residues in the deleted region (residues 465 to 540) are involved in pH signal reception or its conformational consequences and that their absence, coupled with retention of the 138 C-terminal residues, results in insensitivity to the processing protease. If the only function absent from the mutant protein was the pH signal reception or response, an additional deletion at the C terminus should lead to pH-independent processing and alkalinity mimicry. The *pacC*^{c202} frameshift mutation (39) truncates PacC at residue 464 and results in pH-independent processing (25), strongly supporting this conclusion.

Neutrality-mimicking mutations: a new class of *pacC* mutations. Selection and characterization of alkalinity- and acidity-mimicking mutations in PacC have been described previously (1, 6, 25, 39). Except for *pacC*^{c50}, which truncates the protein after residue 266 (25), no mutations truncating PacC upstream of residue 464 and resulting in an alkalinity-mimicking, constitutive phenotype have been characterized (39). To characterize PacC further and define more precisely the site and requirements of processing, we sought mutations in the interval

TABLE 3. Mutant sequence changes in *pacC* and resulting proteins

| Genotype | Phenotype | Mutation | Mutant protein | Reference |
|---|---------------------|--|--|-----------|
| <i>pacC504</i> (<i>pacC5</i>) | ? ^a | G835C (C2528T) | M51 (5→523*) ^d | 39 |
| <i>pacC7604</i> | +/- | ΔC1426 | 5→173 QSLDLATQI* | 39 |
| <i>pacC508</i> | +/- | ΔC1631 | 5→224 SHRTRLTATSTTL* | 39 |
| <i>pacC515</i> | +/- | 1641+A | 5→227 KPVLRLQRLLRSEYRPRASPSVV* | This work |
| <i>pacC230</i> | +/- | ΔT1675 | 5→238 KPAQSLTKRRMNPGRSGVMMRL MSSLVTSSADNLTLIPTLPWASACSV RTCPCLF* | This work |
| <i>pacC20000</i> | c/- | 1711+C | 5→251 QEAGL* | This work |
| <i>pacC63</i> | c | T1734G | L259R | This work |
| <i>pacC20601</i> | c/- | G1739T | 5→260* | This work |
| <i>pacC39</i> | c (ts) ^b | C1754T | L266F | This work |
| <i>pacC50</i> | c | A1758T | 5→266* | This work |
| <i>pacC20603</i> | c | ΔC1792 | 5→278 WASACSVCRTPCLF* | This work |
| <i>pacC20602</i> | c/- | C1817T | 5→287* | This work |
| <i>pacC206</i> | +/- | ΔT1888; T1891C | 5→310 SLVVHMVAALTLRRHIIHFHQ* | This work |
| <i>pacC20604</i> (<i>pacC206</i>) | c/- | ΔG1913 (ΔT1888; T1891C) | 5→310 SLVVHMVAPSPCAGISSSTNE QRPNQERLDQHRPVAANAGHNI* | This work |
| <i>parC2020508</i> | c | Δ1949→1950 | 5→330 EQRPNQERLDQHR- PVPAANAGHNI* | This work |
| <i>pacC2020503</i> | c | Δ1959→1961; 1958+ATT | 5→333 D* | This work |
| <i>pacC69</i> | c | T1977C | L340S | This work |
| <i>pacC67</i> | c | ΔC218; A2182T | 5→407 ILRTPLRLALRL* | This work |
| <i>pacC75</i> | c | C2250G | 5→430* | This work |
| <i>pacC202</i> | c | Δ2353→2555 | 5→464 IDRPGSPFRISGRG* | 39 |
| <i>pacC20205</i> (<i>pacC202</i>) | +/- | ΔC2577 (Δ2353→2555) | 5→464 IDRPGSPL 541→678* | This work |
| <i>pacC14</i> | c | C2437A | 5→492* | 39 |
| <i>pacC5</i> | c | C2528T | 5→523* | 39 |
| <i>pacC2020515</i> and <i>pacC2020516</i> (<i>pacC202 pacC20205</i>) | c | CT560T and C1932T (Δ2353→2555; Δ2557) | 5→464ID* and A323V, respectively | This work |
| <i>pacC200</i> | c | 2690+T | 5→578 T* | 39 |

^a The presence of the *pacC5* mutation prevents the assessment of the phenotype of *pacC504*.

^b ts, thermosensitive phenotype.

^c Both mutations are present in the same revertant, which has a constitutive phenotype.

^d Asterisks denote stop codons.

between the most-downstream characterized partial loss-of-function mutation, *pacC*^{+/-}515, which truncates the protein after residue 227 (39), and codon 464 (Table 3). One technique employed was the reversion of two new extreme-acidity-mimicking loss-of-function mutations (Tables 1 and 3; Fig. 1), *pacC*^{+/-}20205 (described above) and *pacC*^{+/-}206. *pacC*^{+/-}206 truncates the normal protein sequence after residue 310 and results in very low PacC protein levels (data not shown). Among the mutations selected in this way were alkalinity-mimicking mutations such as *pacC*^c20603 and *pacC*^c2020503, which truncate the normal protein sequence after residues 278 and 333, respectively (Tables 1 and 3; Fig. 1). In addition, mutations representing a new class were obtained (Tables 1 and 3; Fig. 1). These neutrality-mimicking or constitutive-depressed (*pacC*^{c/-}) mutations have a range of phenotypes but, in each case, share some aspects of the phenotypes of both alkalinity-mimicking and acidity-mimicking mutations. They do not respond to ambient pH and typically have rather high levels of both alkaline and acid phosphatases. Frequently they also lead to resistance to both molybdate (resembling *pacC*^c mutations) and neomycin (resembling *pacC*^{+/-} and *pacC*⁻ mutations) toxicities. Neutrality-mimicking mutations also include *pacC*^{c/-}20000, which was selected as alleviating the strongly alkalinity-mimicking phenotype of the *pacC*^c200 mutation (39). Particularly noteworthy is *pacC*^{c/-}20604, which replaces the final 12 residues of the 20-residue abnormal PacC206 C terminus by 36 residues, which are also abnormal but are encoded by a different reading frame, showing that low

levels of the *pacC*^{+/-}206 mutant product are possibly due to its abnormal, frameshifted C terminus.

Determination of the processing limit of PacC. We previously proposed that the PacC proteolytic processing limit would be around residue 270 (25). We have characterized several truncating mutations by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) immunoblot analysis and high-resolution EMSA (Fig. 5) to determine this limit with greater precision. In Western analysis, the wild-type processed form, which appears as a doublet (in agreement with EMSA [Fig. 3A and 5]), showed a slight increase in mobility compared to the truncated *pacC*^c50 and *pacC*^{c/-}20601 products and a slight decrease compared to the *pacC*^{+/-}515 product, indicating that the processing site would be located between residues 250 and 260 (see Fig. 5 for predictions of *M_r*). However, the *pacC*^{c/-}20000 product showed unexpectedly reduced mobility, whereas the *pacC*^{+/-}515 product showed a minor band with reduced mobility which was not observed for the *pacC*^{+/-}508 protein (Fig. 5). Small differences in mobility leading to these inconsistencies might reflect differences in amino acid composition, which affects mobility because it affects SDS binding to the polypeptide (and consequently the charge/mass ratio). Basic proteins, acidic proteins, and proteins rich in proline show abnormally reduced mobility by SDS-PAGE (16), and even alterations of a single amino acid change the mobility of p21 ras in SDS-PAGE (32). Both *pacC*^{c/-}20000 and *pacC*^{+/-}515 are truncating mutations introducing frameshifted residues at the C termini of their products (Table 3). *pacC*^{c/-}20000 removes the

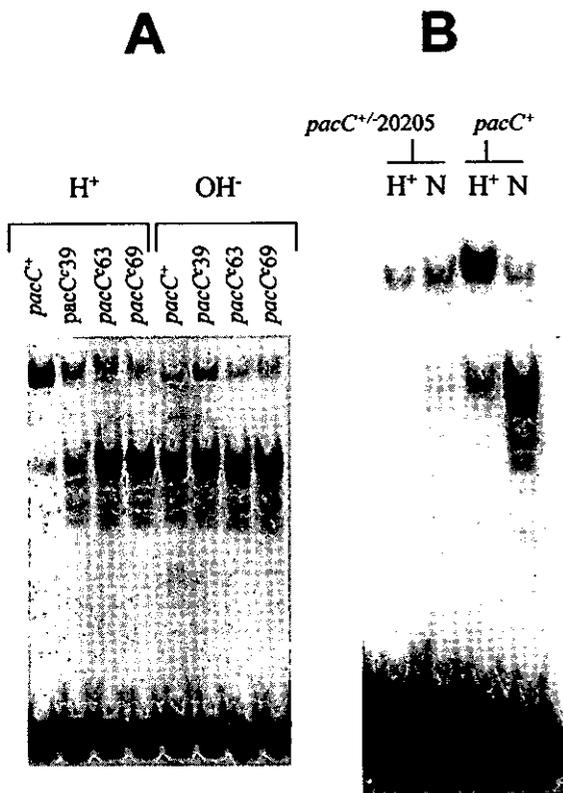


FIG. 4. Single-amino-acid substitutions resulting in pH-independent processing and a deletion resulting in pH insensitivity. EMSAs were performed with the indicated protein extracts. (A) PacC phenotype of single-amino-acid substitution mutations leading to alkalinity mimicry. (B) PacC phenotype of *pacC*^{+/20205}. This acidity-mimicking mutation prevents growth under alkaline conditions. N, neutral pH conditions.

two basic amino acid clusters and introduces a glutamate residue in the frameshifted sequence. Its resulting ~65 C-terminal residues (in a 252-residue protein, starting from Met5) contain no basic (but some acidic) residues and are proline rich. We suspect that one or more of these features may reduce SDS binding and consequently mobility. The *pacC*^{+/515} protein has a 22-residue out-of-frame sequence at its C terminus, including 6 hydrophobic, 6 basic, and 3 proline residues.

Our sensitive EMSA gave much greater resolution than Western blots. In addition, it did not yield the inconsistency detected by Western blotting for the *pacC*^{cl-20000} product and resolved a single band with *pacC*^{+/515} extracts, greatly facilitating the approximate localization of the proteolysis site. This presumably results from the fact that the net charge of the PacC-DNA complex is determined mostly by DNA phosphates, and therefore mass changes in the protein moiety are faithfully translated into mobility changes of the complex. In this high-resolution EMSA, extracts from a *pacC*⁵⁰ (truncating PacC after residue 266) strain revealed a prominent complex of lower mobility than the processed wild-type PacC. Wild-type PacC complex is resolved as a doublet, possibly indicating heterogeneity at the C terminus (Fig. 3 and 5). A minor band, resulting from inefficient processing of the *pacC*⁵⁰ protein, has wild-type mobility (Fig. 5). Therefore, the C terminus of the processed form must be upstream of residue 266. A similar result with *pacC*^{cl-20601} mutant extracts (Fig. 5) placed the proteolysis limit upstream of residue 260. In contrast, the complex formed by extracts of the *pacC*^{+/515}

strain was slightly more mobile than that with the wild-type processed form. Finally, the *pacC*^{cl-20000} strain extracts gave a complex with very slightly reduced mobility. The data in Fig. 5 enabled us to interpolate from a semilogarithmic plot of mutant protein M_r versus relative complex mobility that the most upstream C-terminal limit of the processed PacC form, corresponding to the faster band seen in the wild type, is likely to be within the basic tripeptide Lys252-Lys253-Arg254 or in its immediate vicinity.

Proteolytic requirements C terminal to the processing limit. *pacC*^{cl14}, a chain termination mutation which truncates PacC after residue 492 (39), results in pH-independent processing and elevated levels of processed PacC levels (Fig. 6) (25). Further C-terminal truncation (Table 3 and Fig. 1) to residue 464 (*pacC*²⁰²⁰⁵¹⁵) or 430 (*pacC*⁷⁵) had the same effect (Fig. 6). Truncation at residue 407 (*pacC*⁶⁷) still resulted in nearly complete processing but led to markedly reduced PacC levels (Fig. 6), in keeping with its relatively weak alkalinity-mimicking phenotype. Proteins truncated to residue 333 (*pacC*²⁰²⁰⁵⁰³) or 330 (*pacC*²⁰²⁰⁵⁰⁸) (Table 3; Fig. 1) were largely unprocessed under acidic growth conditions (Fig. 6). Extracts of strains carrying either of the latter two mutations formed, in addition to retardation complexes corresponding to (truncated) unprocessed and normally processed forms of PacC, a new complex having a mobility similar to that of the unprocessed *pacC*⁵⁰ (truncating after residue 266) and PacC(5-265) forms (Fig. 6). PacC in *pacC*⁵⁰ and *alcA*^{P::PacC}(5-265) strain extracts is largely unprocessed (Fig. 5, 6, 7, and 8). PacC in extracts of a *pacC*²⁰⁶⁰³ strain (truncated after residue 278 but with a frameshifted 15-residue C terminus) is present at a relatively low level and processed such that the main complex is approximately equivalent in mobility to that of *pacC*⁵⁰. We conclude that PacC residues 407 to 678 are not required for processing but that truncating the protein at residue 333 or further upstream largely prevents it. Truncation at residue 333 or upstream also gives rise to an aberrant processing product.

The processing protease does not require a specific sequence at the PacC proteolysis site. To determine whether PacC processing requires particular sequences at the proteolysis site, we constructed a mutant allele (*pacC* Δ 1) driving expression (under *alcA*^P control) of a PacC protein with residues 235 to 264 deleted (Table 2; Fig. 1). This 30-residue deletion resulted in constitutive processing under acidic growth conditions, giving a retardation complex indistinguishable in mobility from the processed wild-type *pacC* gene product (Fig. 7A). This implies that the PacC-processing protease does not require a specific target sequence (and also indicates that deletion of these 30 residues facilitates processing). To ensure that the processing of this deletion protein was not atypical, two further constructed deletion alleles plus a frameshift mutation obtained by classical genetics were analyzed for their effects on processing. Full-length PacC proteins with residues 251 to 270 (*pacC* Δ 2 allele) or 235 to 300 (*pacC* Δ 3 allele) deleted (Table 2; Fig. 1) resemble the *pacC* Δ 1 product in yielding processed products indistinguishable in mobility from the wild type by EMSA (Fig. 7B and D). The acidity-mimicking *pacC*^{+/230} frameshift mutation truncates the normal protein sequence after residue 238, which is then followed by 55 residues encoded in the -1 reading frame (Table 3; Fig. 1). *pacC*^{+/230} results in low PacC levels, but processing appears to remove ~40 frameshifted residues so that the retardation complex is of processed wild-type size (Fig. 7C). These results strongly suggest that the protease recognizes PacC sequences or structural features located upstream of residue 235 and cleaves the protein at a distance downstream from the recognition site.

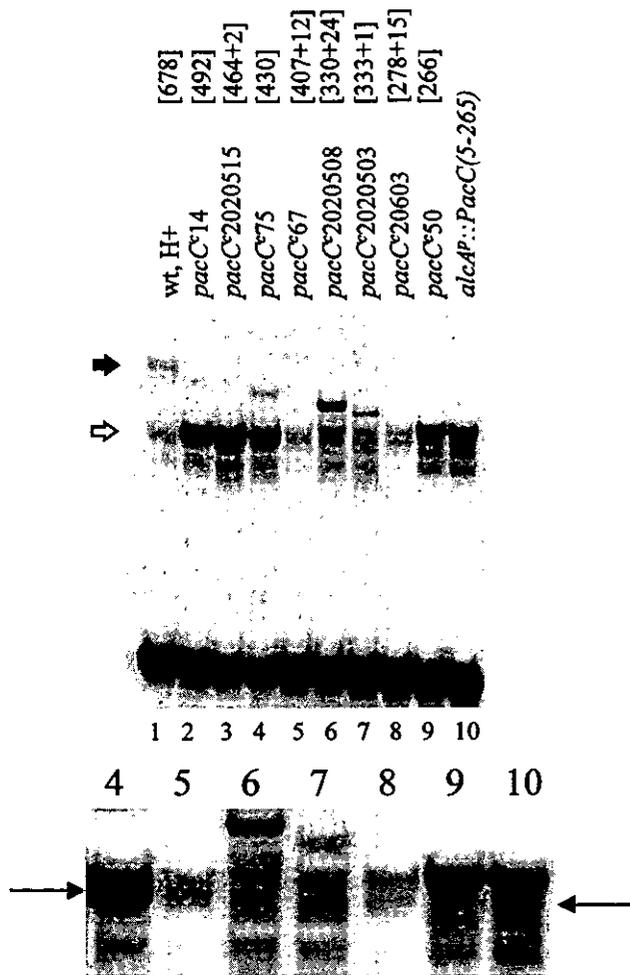


FIG. 6. Processing of mutant *pacC*^{*} proteins truncated upstream of residue 492. EMSAs were performed with the indicated protein extracts. All cultures were grown under acidic conditions, using PPB with 3% sucrose, except that for lane 10, which was grown under inducing (and acidic) conditions for *alcA*^P. Closed and open thick arrows denote the full-length and processed wild-type PacC proteins, respectively. Thin arrows in the enlarged portion of the autoradiogram indicate the position of the wild-type processed form. Numbers within brackets after mutations show the C-terminal residues of the products, with the number of additional residues added after frameshift mutations preceded by a +. See Table 3 for details.

the two PacC forms detected in extracts. The full-length form has a relatively short half life, as a result of its conversion to the much more stable processed form. Second, we confirm that PacC processing requires the *pal* signal transduction pathway. Mutational inactivation of this pathway does not affect stability of the processed form of PacC but markedly stabilizes the full-length form.

Using *pacC504*, which results in an M5I substitution and shifts translational initiation to codon 1, we demonstrated that proteolytic processing does not remove N-terminal residues and showed that the major translational initiation codon for PacC is AUG codon 5. The context of *pacC* codon 5 conforms more closely than that of codon 1 to the consensus for a strong initiation codon deduced for the *A. nidulans areA* gene (2). The fact that *pacC504* does not lead to a loss-of-function phenotype shows that codon 1 is competent in translational initiation, even if it does not prevent leaky scanning. It is therefore

possible that in the wild type a minor proportion (below current detection limits) of translation initiates at codon 1.

PacC processing is the pH-sensitive step leading to changes in gene expression in response to ambient pH. The activity of the processing protease is apparently not pH regulated, as C-terminal truncating *pacC*^{*} mutations result in alkalinity mimicry and pH-independent processing (reference 25 and this work). Thus, the actual pH-regulated step is very likely to be the transition of PacC from a protease-insensitive to a protease-sensitive conformation. Under acidic growth conditions, interactions between C- and N-terminal moieties disrupted by C-terminal truncations would help maintain PacC in the protease-inaccessible conformation. Among the predictions of this model are that (i) *pacC* mutations outside the C terminus should also disrupt such interactions and result in pH-independent processing and a *pacC*^{*} phenotype and (ii) *pacC* mutations rendering the protein insensitive to the alkaline pH signal or locking it in the protease-inaccessible conformation should result in a loss-of-function, acidity-mimicking

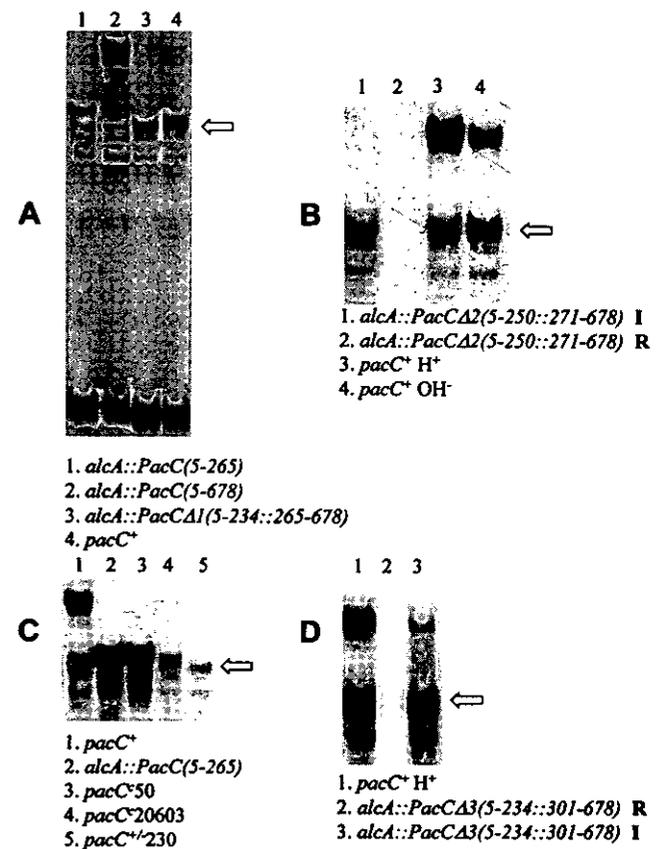


FIG. 7. Processing of PacC mutant proteins lacking the processing site. EMSAs of the indicated protein extracts were performed with the synthetic *ipnA2* site as a probe. The arrows indicate the mobility of the complex formed by the processed PacC form. In panels A, B, and D, expression of indicated mutant PacC proteins was driven by *alcA*^P and repressing or inducing growth conditions were used, as indicated below. (A) Data for PacC(5-234::265-678). Inducing (also acidic) growth conditions were used for *alcA*^P. The low levels of the full-length form in lane 4 (wild type) are probably due to alkalization resulting from threonine catabolism throughout growth. (B) Data for PacC(5-250::271-678). In lanes 1 and 2, mycelia were pregrown under repressing conditions and transferred for 6 h to acidic inducing (I) or repressing (R) conditions, as indicated. (C) Data for *pacC*^{+/+}230. Acidic growth conditions were used (in lane 2, *alcA*^P inducing conditions were also used). (D) All cultures were grown under acidic conditions. In lanes 2 and 3, mycelia were pregrown under repressing conditions and transferred for 6 h to repressing (R) or inducing (I) conditions, as indicated.

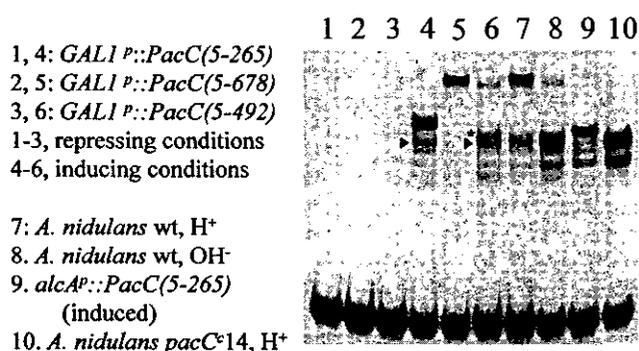


FIG. 8. Processing of PacC in *S. cerevisiae*. In lanes 1 to 6, cultures of yeast strains containing the indicated constructs were grown under inducing or repressing conditions for *GAL1*^P and used to prepare protein extracts, which were assayed by EMSA for PacC DNA binding activity. Control *A. nidulans* extracts were included, as indicated. Arrowheads denote the appropriately processed product in *S. cerevisiae*, whereas an aberrantly processed product is starred. wt, wild type.

phenotype. The L259R, L266F, and L340S substitutions are very likely to fall into the former class. The acidity-mimicking *pacC*^{+/−}20205-containing allele is an example of the latter.

Leucine residues at positions 259, 266, and 340 are probably involved, directly or indirectly, in processing-preventing interactions with the C terminus. Constitutive (pH-independent) processing of mutant proteins with residues 235 to 264 or 251 to 270 deleted confirms the involvement of the environs of the processing site in interactions preventing processing and provides compelling evidence against the alternative interpretation that the L259R and L266F substitutions increase affinity for the processing protease (a possibility that would otherwise be formally equivalent to increased accessibility). The involvement of Leu340 in interactions with the C terminus has been established (13).

Analysis of a collection of PacC proteins mutationally truncated in the environs of the processing site(s) indicated slight heterogeneity at the C terminus of the processed form, with the most amino-proximal processing site located within or in the immediate vicinity of the basic sequence Lys252-Lys253-Arg254 and the most amino-distal limit located a further four residues downstream (Fig. 3 and 5). Processing requires a certain polypeptide chain length downstream of the proteolysis site. Truncation at residue 407 or downstream allows faithful and efficient processing. In contrast, PacC proteins ending at residue 265 or 266 (i.e., 13 or 14 residues downstream of Lys252) are inefficiently processed. Extension to residue 278 or 330 somewhat improved processing, although a significant proportion of the processed product was larger than the wild-type processed form, indicating aberrant processing. The sizes of these aberrant processing products appear to be very similar to that of an unprocessed product having Leu266 at its C terminus.

Internal deletion of the processing site(s), removing 17 residues upstream and 10 residues downstream of the Lys252-Lys253-Arg254 tripeptide, did not prevent processing, indicating a lack of specificity of the protease at the cleavage site. The processed mutant product is indistinguishable in size from the wild type and cannot result from processing at the downstream Lys267-Arg268-Arg269 tripeptide, as the resulting protein (233 to 235 residues beginning from Met5) would be detectably smaller than the wild-type processed form (248 to 250 residues). In addition, proteins with residues 251 to 270 or 235 to 300 deleted (therefore with both basic tripeptides removed) are efficiently and faithfully processed to wild-type size. This strongly suggests that the protease recognizes sequences or

structural features of PacC upstream of residue 235 and cleaves at a distance downstream from the recognition sequence. Analysis of the *pacC*^{+/−}230 product strongly supports this conclusion, as the 55-residue frameshifted peptide following residue 238 is appropriately cleaved, giving a processed form of approximately wild-type size. This not only confirms the lack of specificity at the cleavage site but shows that a completely different amino acid sequence can fulfil the minimum requirement for residues C terminal to the cleavage site for faithful processing.

A similar situation in which a processing protease cuts at a distance from its specificity determinants has been described for processing of the NF- κ B and NF- κ B2 p50 and p52 precursors, p105 (21) and p100 (4), respectively. The involvement of the ubiquitin-proteasome pathway in this reaction seems to be well established (26, 27) but raises questions of how a protein which has been ubiquitin tagged for proteasome-mediated proteolysis is not entirely degraded (27). Evidence presented by Lin and Ghosh (21) strongly suggested a two-step mechanism involving a signal-dependent endoproteolytic cleavage of p105 followed by degradation of the C-terminal moiety. They also demonstrated the presence of a context-independent 23-amino-acid signal ending 38 residues upstream of the target peptide bond which provides the cleavage specificity for the release of p50 from p105. This two-step mechanism would satisfactorily explain the partial degradation of the precursor, in which proteasome-dependent proteolysis of the released C-terminal fragment would be governed by the N-end rule (21). In common with our data for PacC, specific sequences at the cleavage site of p105 are not required. A similar conclusion was reached by Betts and Nabel (4) for processing of NF- κ B2 p100.

A. nidulans PacC is a prototype of a family of filamentous fungal and yeast transcription factors having a homologous three-zinc-finger DNA binding domain and undergoing activation by proteolytic processing. *S. cerevisiae* Rim1p is also proteolytically activated in response to alkaline ambient pH (20). *rim1* mutants show poor growth at low temperatures, altered colony morphology, inefficient sporulation, and defective invasive growth (20, 35), but the connection between these phenotypes and the absence of transduction of a pH-dependent signal through Rim1p is unclear. In contrast, it is well established that *Y. lipolytica* YIRim101p mediates pH regulation (18). Although proteolytic activation of YIRim101p is to be expected, based on the alkalinity-mimicking phenotype of C-terminal truncating mutations (18), it has not yet been reported.

Genes involved in transducing the ambient pH signal have been genetically identified in *S. cerevisiae* (*RIM8*, -9, and -13 [20, 35]) and *Y. lipolytica* (*PAL1*, -2, -3, and -4 [18]), and they might be isofunctional homologues of *A. nidulans* *pal* genes. Indeed, *S. cerevisiae* Rim9p shows 36.7% identity over 180 residues, including nearly all of the four hydrophobic, putative transmembrane segments, to *A. nidulans* PalII, but it lacks any sequence corresponding to the very basic, hydrophilic, C-terminal ~400 residues of PalI (9). Sequence comparisons have also been useful in identifying putative yeast homologues of deduced *pal* gene products. Thus, PalB, which is likely to be a cysteine protease of the calpain family (10), shows significant similarity to the derived translation product of *S. cerevisiae* YMR154c in the catalytic domain and PalB homology domain (34). PalA shows 30.2% identity over 732 residues to the derived translation product of *S. cerevisiae* YOR275c (24). PalF shows short regions of similarity to derived translation products of *S. cerevisiae* YGL045w and YGL046w (23). The ability of C-terminally truncating gain-of-function mutations in *RIM1* and *YIRIM101* to bypass loss-of-function mutations in their

respective signal transduction genes strongly suggests that the PacC model applies to its yeast homologues. However, the considerable sequence divergence in putative signal transduction homologues as well as within the transcription factors themselves outside the DNA binding domain (18, 39) provides a possible rationale for why the PacC primary translation product fails to undergo significant processing in *S. cerevisiae* (at least under the growth conditions tested). Very significantly, however, a mutant form of PacC truncated after residue 492, whose processing is independent of ambient pH (i.e., *pal* pathway) signalling, underwent processing to the correct size in *S. cerevisiae*, although some processing was aberrant. Thus, appropriate processing of PacC can definitely occur in yeast. An important question for the future is whether the same proteolytic activity is responsible for PacC and Rim1p processing and would thus represent a conserved proteolytic control point for transcription factors of the PacC-Rim1p family.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Teresa Suárez and Lynne Rainbow for discussions and Elena Reoyo for technical assistance.

We are grateful for support of the EU through Biotech contract BIO4-CT96-0535 (to M.A.P. and H.N.A.), the BBSRC through grant 60/P05893 (to H.N.A.) and research studentships (to C.V.B. and S.S.), the CICYT through grant BIO97-348 (to M.A.P.), the MEC and the Gobierno Vasco through PNFPI (to J.M.M.) and PFI (to E.D.) fellowships, respectively, and the DGICYT for a postdoctoral contract (to M.O.).

REFERENCES

- Arst, H. N., Jr., E. Bignell, and J. Tilburn. 1994. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**:787-790.
- Arst, H. N., Jr., and A. Sheerins. 1996. Translational competence, 'leaky scanning' and translational reinitiation in *areA* mRNA of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **19**:1019-1024.
- Belvin, M. P., and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**:393-416.
- Betts, J. C., and G. J. Nabel. 1996. Differential regulation of NF- κ B2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6363-6371.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**:331-340.
- Caddick, M. X., A. G. Brownlee, and H. N. Arst, Jr. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**:346-353.
- Clutterbuck, A. J. 1993. *Aspergillus nidulans*, p. 3.71-3.84. In S. J. O'Brien (ed.), Genetic maps. Locus maps of complex genomes, 6th ed., vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Cove, D. J. 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**:51-56.
- Denison, S. H., S. Negrete-Urtasun, J. M. Mingot, J. Tilburn, W. A. Mayer, A. Goel, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, and H. N. Arst, Jr. 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* **30**:259-264.
- Denison, S. H., M. Orejas, and H. N. Arst, Jr. 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **270**:28519-28522.
- Dorn, G. 1965. Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* **6**:13-26.
- Espeso, E. A., and M. A. Peñalva. 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**:28825-28830.
- Espeso, E. A., T. Roncal, E. Bignell, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. Unpublished data.
- Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sánchez-Pulido, C. V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**:466-480.
- Fernández-Cañón, J. M., and M. A. Peñalva. 1995. Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:110-118.
- Hames, B. D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, p. 1-147. In B. D. Hames and D. Rickwood (ed.), Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali ions. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.
- Lambert, M., S. Blanchin-Roland, F. Le Louedec, A. Lépingle, and C. Gailardin. 1997. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a *RIM101/pacC* homolog. *Mol. Cell. Biol.* **17**:3966-3976.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
- Lá, W. S., and A. P. Mitchell. 1997. Proteolytic activation of RIM1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**:63-73.
- Lin, L., and S. Ghosh. 1996. A glycine-rich region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2248-2254.
- MacCabe, A. P., M. Orejas, J. A. Pérez-González, and D. Ramón. 1998. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J. Bacteriol.* **180**:1331-1333.
- Maccheroni, W., G. S. May, N. M. Martinez-Rossi, and A. Rossi. 1997. The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**:163-167.
- Negrete-Urtasun, S., S. H. Denison, and H. N. Arst, Jr. 1997. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* **179**:1832-1835.
- Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**:1622-1632.
- Orian, A., S. Whiteside, A. Israel, I. Stancovski, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover. 1995. Ubiquitin-mediated processing of NF- κ B transcriptional activator precursor p105. *J. Biol. Chem.* **270**:21707-21714.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg, and T. Maniatis. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78**:773-785.
- Pu, R. T., and S. A. Osmani. 1995. Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* is required for mitotic exit. *EMBO J.* **14**:995-1003.
- Rand, K. N. 1978. Aspects of the control of nitrogen metabolism in *Aspergillus nidulans*. Ph.D. thesis. University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.
- Ruiz i Altaba, A. 1997. Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* **90**:193-196.
- Sarkar, S., M. X. Caddick, E. Bignell, J. Tilburn, and H. N. Arst, Jr. 1996. Regulation of gene expression by ambient pH in *Aspergillus*: genes expressed at acid pH. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:360-363.
- Seeburg, P. H., W. W. Colby, D. J. Capon, D. V. Goeddel, and A. D. Levinson. 1984. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* **312**:71-75.
- Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Suzuki. 1997. Structure and physiological functions of calpains. *Biochem. J.* **328**:721-732.
- Su, S. S. Y., and A. P. Mitchell. 1993. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**:67-77.
- Su, S. S. Y., and A. P. Mitchell. 1993. Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res.* **21**:3789-3797.
- Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. NF- κ B: a lesson of family values. *Cell* **24**:529-532.
- Thomas, B. J., and R. Rothstein. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**:619-630.
- Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Peñalva, and H. N. Arst, Jr. 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**:779-790.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington, and R. W. Davies. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**:205-211.

Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous

Steven H. Denison,^{1,2} Susana Negrete-Urtasun,¹ José Manuel Mingot,³ Joan Tilburn,¹ Wendy A. Mayer,² Alpa Goel,² Eduardo A. Espeso,¹ Miguel A. Peñalva,³ and Herbert N. Arst Jr^{1*}

¹Department of Infectious Diseases, Imperial College School of Medicine at Hammersmith Hospital, Ducane Road, London W12 0NN, UK.

²Department of Biology, Mississippi College, Box 4045, Clinton, MS 39058, USA.

³Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Velázquez 144, Madrid 28006, Spain.

Summary

The zinc finger regions of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor, mediating regulation of gene expression by ambient pH, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim1p transcription factor, mediating control of meiosis and invasiveness, are homologous and both transcription factors undergo proteolytic processing of the C-terminus for conversion to the functional form. In both cases, functioning of a signal transduction pathway involving several gene products is a necessary prerequisite for processing. We now show that the *Aspergillus* Pall pH signal transduction component is homologous to the *Saccharomyces* Rim9p meiotic signal transduction component throughout a region containing four hydrophobic, putative membrane-spanning segments. This suggests that Pall might be a membrane sensor for ambient pH. Deletion of the *pall* gene established that the less extreme phenotype of *pall* mutations compared with mutations in the other five genes of the pH signalling pathway is a general feature of *pall* mutations.

Introduction

In the fungus *Aspergillus nidulans* the expression of many genes involved in the synthesis of permeases, secreted enzymes or exported metabolites is subject to regulation by ambient pH (Caddick *et al.*, 1986; Shah *et al.*, 1991;

Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995; Espeso and Peñalva, 1996; MacCabe *et al.*, 1998), ensuring appropriate expression with respect to pH (e.g. secretion of acid phosphatase in acidic environments and alkaline phosphatase in alkaline environments). The zinc finger transcription factor PacC activates expression of genes expressed at alkaline pH and prevents expression of genes expressed at acidic pH (Caddick *et al.*, 1986; Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1997). The 73 kDa PacC full-length translation product is apparently inactive but undergoes pH-dependent proteolytic processing to an ≈ 29 kDa N-terminal functional form (Orejas *et al.*, 1995). Processing of PacC is triggered by the pH signal transduction pathway, involving the products of the *palA*, *-B*, *-C*, *-F*, *-H* and *-I* genes (Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994; Orejas *et al.*, 1995). Loss-of-function mutations in these six *pal* genes result in an acidity-mimicking phenotype. Sequence analysis has, as yet, failed to clarify the functions of the *palA* and *-F* gene products (Maccheroni *et al.*, 1997; Negrete-Urtasun *et al.*, 1997), but the *palB* product is almost certainly a cysteine protease of the calpain family, albeit not the protease responsible for the final proteolytic processing of PacC (Denison *et al.*, 1995).

No systematic study of pH regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been reported, but sequence comparisons have indicated the presence of putative homologues to components of the *A. nidulans* pH regulatory system. The zinc finger region of the *S. cerevisiae* regulator of meiosis and invasive growth Rim1p (Su and Mitchell, 1993a,b; Li and Mitchell, 1997) is homologous to that of PacC (Tilburn *et al.*, 1995). Like PacC, Rim1p undergoes pH-dependent proteolytic C-terminal processing to its functional form (Li and Mitchell, 1997). *S. cerevisiae* hypothetical proteins that are possible homologues for the products of the *palA*, *-B* and *-F* genes have been identified (Maccheroni *et al.*, 1997; Negrete-Urtasun *et al.*, 1997; Sorimachi *et al.*, 1997). There is, however, no evidence that any of these hypothetical proteins have any involvement with Rim1p. Here we present evidence for homology of the *pall* gene product Pall to Rim9p, a putative membrane protein acting upstream of Rim1p (Su and Mitchell, 1993a; Li and Mitchell, 1997). This suggests that, even if PacC and Rim1p might have diverged in regulatory roles and signals to which they respond, each has retained the services of the ancestral signal transduction pathway. Pall, like Rim9p, contains

Received 18 May, 1998; revised 11 July, 1998; accepted 15 July, 1998. *For correspondence. Tel. (0181) 383 3436; Fax (0181) 383 3394.

putative transmembrane domains and might therefore be a membrane-associated sensor of ambient pH. A less extreme phenotype is a feature of *pall* mutations compared with mutations in the other five pH-signalling *pal* genes.

Results

The *pall* gene was cloned using linkage group III (containing *pall*) clones from a chromosome-allocated wild-type *A. nidulans* cosmid library (Brody et al., 1991) and pLJ16 (Johnstone et al., 1985) by identification of *pall*⁺ co-transformants by their ability to grow as well as wild-type on 33 mM molybdate-containing medium (Caddick et al., 1986; Arst et al., 1994) among transformants selected as *argB*⁺. *pall*30-rescuing activity was identified in cosmid pWE15 29D02 and further localized to a 4 kb *Kpn*I/*Sac*II fragment (Fig. 1A). To confirm that this fragment contains *pall*, the internal 2.2 kb *Sac*I/*Hpa*I fragment (Fig. 1A) was replaced with the *pyr*4 gene of *Neurospora crassa* and pyrimidine prototrophic transformants were selected in an *A. nidulans pyr*G89 strain. Seven transformants were indistinguishable from strains carrying *pall*30, -32 or -49 in their lack of alkaline phosphatase, overproduction of acid phosphatase, hypersensitivity to molybdate toxicity, resistance to neomycin toxicity and reduced growth at pH 8 (Caddick et al., 1986; Arst et al., 1994). Southern blotting (not shown) showed all seven to contain homologous gene replacements. One gene replacement mutation was shown to be recessive and not to complement *pall*30 in diploids. Consistent with the *pall* map location (Arst et al., 1994), this replacement mutation mapped between the *sps*A1 and *cnx*H4 mutations in linkage group III based on parasexual analysis (McCully and Forbes, 1965) and classification of 224 progeny from a meiotic cross. Final confirmation that the *pall* gene had been cloned was provided by identification of sequence changes responsible for the *pall*30, -32 and -49 mutations (see below).

In Northern blots using total RNA, the 2.2 kb *Sac*I/*Hpa*I fragment hybridized to a single mRNA of \approx 2.6 kb. Levels of this (*pall*) mRNA were not affected by the alkalinity-mimicking mutation *pacC*^c11 or the acidity-mimicking mutation *palF*15 (data not shown). This lack of effect of *pacC*^c11 and *palF*15 stands in marked contrast to the behaviour of transcripts whose synthesis is controlled by the PacC-mediated pH regulatory system (Tilburn et al., 1995) and indicates that this regulatory system, of which the *pall* gene product is a component, does not regulate *pall* expression.

The sequence of a genomic region of 2729 bp containing the 2.2 kb *Sac*I/*Hpa*I fragment is shown in Fig. 1B. Sequencing of cDNA clones showed the presence of two introns of 48 and 59 nucleotides respectively (Fig. 1B). Based on an estimated mRNA size of \approx 2.6 kb, the longest cDNA, containing 2521 bp, is likely to be nearly full length

once polyadenylation is taken into account. The open reading frame would encode a protein of 601 amino acids having a molecular mass of 64.6 kDa (Fig. 1B). The gene replacement transformants lacking the *Sac*I/*Hpa*I fragment contain none of the coding region (Fig. 1B).

In alignment with the 239 residue Rim9p of *S. cerevisiae*, Pall shows 36.7% identity over 180 residues, including nearly all of the hydrophobic, putative transmembrane segments (Fig. 2). Two *S. cerevisiae* hypothetical proteins (accession numbers S66701 and P43595) also show similarity to Pall over this region. We have been unable to detect significant sequence similarity in database entries to the highly hydrophilic C-terminal \approx 70% of Pall that lies outside the region of Rim9p homology.

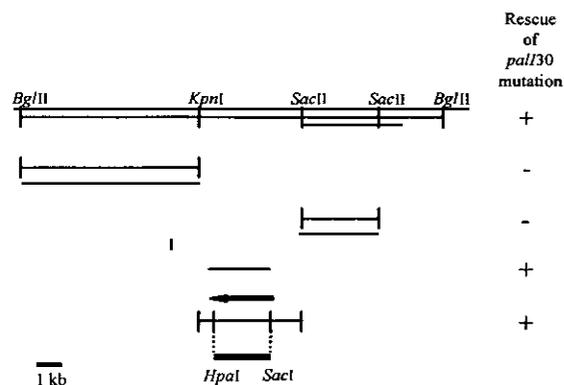
The *pall*30 mutation changes nucleotide 139 from G to A, resulting in a G47→D substitution in the Pall protein, whereas *pall*32 is a deletion of nucleotide 299, truncating the protein after residue 83 followed by the out-of-frame peptide SHFLLSLSSTRSLLFSL, and *pall*49 changes nucleotide 237 from G to A, truncating the protein after residue 63 followed by the out-of-frame peptide GNRKHWKYG. *pall*30 results in a non-conservative change in a residue conserved between Pall and Rim9p in a slightly hydrophobic part of the mainly hydrophilic region between the first two putative transmembrane domains. The *pall*32 frameshift results in loss of more than five-sixths of the protein. In *pall*49 a transition mutation destroys the 3' splice site of intron 1 but creates another potential 3' splice site (AAG) two nucleotides downstream. Sequencing of an RT-PCR product from total RNA from a *pall*49 strain (data not shown) showed that this mutationally created 3' splice site is used in the splicing of intron 1, shifting translation into the +1 reading frame and resulting in loss of nearly 90% of the Pall protein.

Figure 3 shows the PacC protein composition of extracts of *pall* mutants grown under acidic or neutral conditions using a sensitive electrophoretic mobility shift assay. In common with other pH-signalling *pal* mutations, *pall* loss-of-function mutations largely prevent PacC processing, even under neutral growth conditions [alkaline growth conditions cannot be used because *pal* mutant strains grow poorly or not at all (Caddick et al., 1986; Arst et al., 1994; Denison et al., 1995)]. Both the *pall* deletion mutation and *pall*30 would appear to allow a small amount of PacC processing under neutral growth conditions, albeit not if *palA*1 or *palF*15 is also present. This recalls the earlier observation (Arst et al., 1994) that mutations in *palA*, -B, -C, -F and -H are epistatic to the phenotypically less extreme mutations in *pall*.

Discussion

Characterization of the *A. nidulans pall* pH signal transduction gene product reveals it to be homologous at its

A



B

-534 CTTGTGTCAAGTGAATTTTGGCTGTAATCCCAAAATAGTAAAGAAAGGAGTGGGCATATCATGGAATGAGACAGTCGATGACTAAGACCCGCCCTTTAACTATTGAGTCTTTCCCTCAACTTGC
 -404 CGACGCCATCCTTAAAGCAATCAATCAAGCGCGCTCATGCTTATACCTTATCCACCATTACCATCGTCGCTAGCCAGTTACTACTACCTTAGTACACTATCTCTCCATTGATTGAGGCTCTTTTTTC

*Sac*I

tsp

-274 TCTTTTCTATCTCTCTTGTGTCGACAAAGACTCTTCGCTTTCGCTTATGCGCTACTCGTACTGCGGCCCTCCCTCTGCTCTCTTTCCGCCCTTTACCCCAAGTTCTTCCAG
 -144 GAGAAGCGCTGCTGCAATCAATGCTACGCTCAATGCTATACTTTTAGAGTTTATTATCCGCTTGGCGAGCTGCTGTCTGGGGCAGTACCTGACGTTGCTTTCCCTACACTCTGTCCGACGGCGGTT
 -14 GTCTTGGTGGCAATGTTGCTCAACCGGCAACCCCATTGACCATCCTTCTCCTGATCGGCTTCTCTCTCCGTCGATATCGACTCTATTGTTAAAGATATTCCGTTGGCAACTTTGTA
 1 M L L K P A T P L T I L L L I A F V L L L L S V I S T P I V K S I P L A T F D
 116 CAATGTCGAATATGGGCTCTTCGCTTATTGCAAAAGCTGGCACTTGCACCGCATCCACATCGGCTATACCACAGTTTGTTCGCTTACCCCTCAGGCTGAGGTCGCTAATCTTAGCGCAGAGGAATC
 40 N V E Y G V F G Y C K A G T C T A I H I G Y T T E E I
 246 GAAAACACTGGAAGTACGGACAGCGACTTTAACCTCCCGTCCGACGCGGGAGATCACTTCTTCTATCCTTATCGTCCACCCGATCGCTGCTTTTCTCACTTTGATCTGCCTTGTCTCGCTGCGG
 67 E N T G S T D S D F N L P S D A R R S L S S I L I V H P I A A F L T L I C L C L A A A A
 376 CTCACTGCACGCTCCGTCGGATTGCGCTCGCTACTTACTGGCCTTGTGATCTTCTGCTCCTTCCGACTCTTCTCGTCTGCTTGTGCTTTCCTGGTCGATATACTGCTCTTTGTGCCCATTTGTCATG
 111 H L H A P S H S P R Y L L A L L I L L L P T L L V S L L A F L V D I L L F V P H L S W
 506 GGGTGGCTGGATGTTCTGCGCGCGACTATTATCCTGGTCACTTGGCGTGTGTGACATTTGTCACATTTGTCACATGCGCCGACTCTGCTCAGTCGCAAGGCTCGCAAGAGCGCATCGCGGAAAATGCCGAATGAGT
 154 G G W I V L A A T I I L V T C G V V T C A M R R T L V S R K A R K R R I A E N A E M S
 636 GGGCAGAACTACTATAATCGTCAGAACCGCGTCCGCTGCAATGAATGAGAGCAAGCCATCGCCCTGAAGCCAAAGAACCTTCGCTCGCTCAAAAGCTCAGAGTCGGGGCTACGTTCCGCA
 197 G Q N Y Y N R Q N A A A A L N E S K P I A P E A K E T F V A A T Q S S E S G P T F A T
 766 CCTTTCGCAAAACAGCGTTCAAGTACGACGATCGTACAGCTTAATAAACAACAGCGATCCGAGCGCCAAAGACGCTGGGTATCAGTCGGGATTCCCTGGAGATCCAGTTCTATACGCCCCCTG
 241 F R T N T R S S D D D R T P L N N H S D P S A Q D A G Y Q S R I P G D P V P V N A P R
 896 AGATGATTTCCGGACCCGTTACACACAGAGCCCTACACTCCGCTCCTAGATGCGTACGCTGGACTCTGTCAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGTCCAGAGT
 284 D D F G N P L P P G A Y N S A F R M R T P G P P P P D S R V R D Q Y S D P P R G
 1026 CCCCCTACAGGATTTGCTCCGCGCGGCTTACCCCTCCGCGGAGATATGGTGGTGGCGGACTTACGAGGCGCCGATCCGCGCCCATCTCCTGCTCCTCACCAGCGGGGCTGCTATA
 327 P P T G F A P R G R G C Y P P R G G Y G R G S P Y G C P Y C P N S R A P L T G R G G Y M
 1156 TGGSCCAATCCGCGCGGACTCAGGACCGATGCGACGTCGAGGATACCGCGCCGCAACCGGACGCGCGGATATGCTAACGACCGCAATGGTGAAGATGATACGGATATCGTGGACCTTCGTC
 371 G P M R G G F A G F M A R G G Y R P Q P A A G G Y G N A R A M G E D E Y G Y R G P S S
 1286 AGCCGACGACTCCCGGCAATGGCGCGCCAGCGCTCCGCGCCAGCTGCGCGCAGCTATTAATGATGCGCGCGCGCATGAGCCGATGCTCAGGATGAGTACCTGAGCAGCAACAACTC
 414 R Q R T P G P M A A P A A F P A G Q A I E M M P Q P R H E P D A Q D E V F E Q Q Q L
 1416 CATGCCATTTCCATGATAATCAGCAGAGCTGTAGCCCCACGAGCCTTTAAGCCGACACAGCTCATGGCTGTTCAACCTCTCTGTTTCTCAAAAAATAGCTAATCGCTTCAACCAGGTCATA
 457 H A I S I D N Q H E P V S P T S L Y S R T Q S Y
 1546 TGTGCCCCCGTAGAATTTGGGAGCGCAAGCATACCAATCGGAGCGCAACTTGCATATCAACCTAATCAACCAGGATCCCGCTCCAGTCAGGATGATGATTACGAAGATGAGGACCG
 481 V P P R R N W G P Q A Y Q S S E P N L P Y Q F N O P R H A R S Q S G S M Y Y E D E D P
 1676 GTGTACACAGTTCGGAACGAGTCCGAGTTGTAATCAGGATACCTCTGCTTGAAGCCAGGCAATTTCTGGTGAAGCAAAATTAAGAGAAAATGGGCGCAACCTCCGGCTCACCCTGCTGCTAGCG
 524 V Y T S R N E S A V G N S G V P S V L T P G N S G E Q K L K E N G A E R P T G S P A A S E
 1806 AAGTAAGCCATTGACGCTATATCGGAGCGCCCAATCAACCCCAAGTGTGTCGCCCCCTATCGCGCACAGCTGTCAACAGAAAGCGGACGCTCTACTCGAGATAATCCGACTTTGACTTCGGGGCCG
 568 V S H L T S Y R S G Q S T S P V R S G L R C H K L F N R S A T S Y S R

*Hpa*I

1936 CATCGGAGGAGCGGAGTATGCCACCGTTAACCGGCAAGAACTCTACGAGATACCAATTCCTAAATATTTCTTCATTGTTAATGATGGTATCGGCGTCTGTTGTTATGCAATGGATTGTTTCAT

2066 CCATCTCAACTGCTTACTCCACCGCAAGGACATGATGGAATTCAGCAAGTGTGGTGGCCCTGGTGGACTGTACAAACATGAGTCTGGTACATAATAGATAGTAGGATGAGGATGATTAATCAG

Fig. 1. A. Partial restriction map of the *pall* region, ability to rescue the *pall30* mutation by genomic fragments and a cDNA clone, position and orientation of the *pall* transcript, and position of the fragment deleted in the *pall* gene disruption. The above 16.5 kb *Bgl*II fragment of cosmid 29D02 was found to restore wild-type growth of a *pall30* strain on medium containing 33 mM molybdate upon transformation (indicated by +). The 7 kb *Bgl*II/*Kpn*I and 3 kb *Sac*I fragments shown fail to rescue *pall30*, but the 4 kb *Kpn*I/*Sac*II fragment rescues and was used as a preliminary probe for Northern blots and in screening for cDNAs. The 2.4 kb cDNA insert of cDNA1 also rescues and is indicated by a horizontal line not bounded by vertical lines. The arrow indicates the direction and location of the *pall* transcriptional unit. The shaded bar indicates the position of the 2.2 kb *Sac*I/*Hpa*I fragment that was replaced by the *N. crassa pyr4* gene for the disruption. B. Nucleotide and derived amino acid sequences of *pall* (accession no. AJ007629). The positions of the *Sac*I and *Hpa*I restriction sites used in constructing the deletion are shown. Asterisks above the line indicate boundaries of cDNA clones where these occur outside the coding region. None of the three cDNA clones sequenced is polyadenylated. Transcription start points (*tsp*) were determined by 5' RACE using the GIBCO BRL Version 2.0 system.

N-terminus to the *S. cerevisiae RIM9* meiosis and invasiveness signal transduction gene product. The hydrophobicity plot of *Pall* leads us to suggest, as previously proposed

for its homologue *Rim9p* (Li and Mitchell, 1997), that it is a membrane-associated sensor. If so and if all four hydrophobic segments are membrane-spanning domains, then

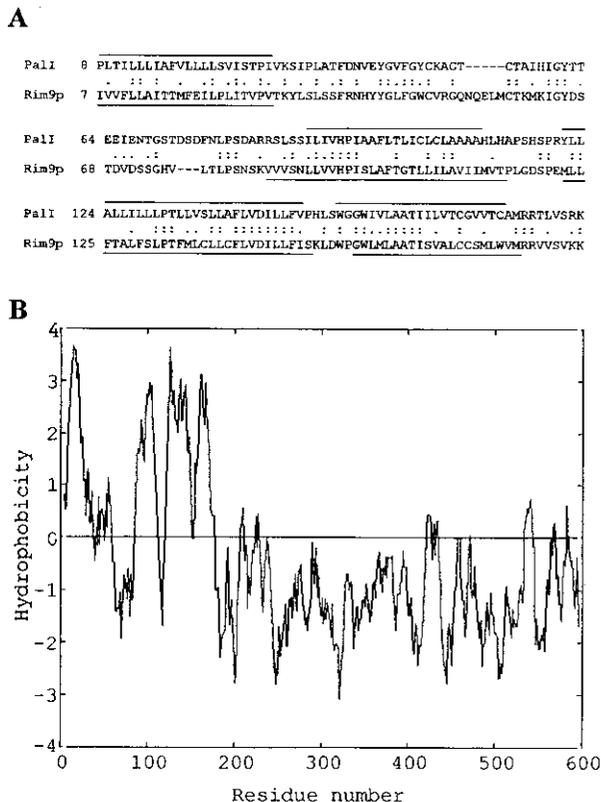


Fig. 2. Alignment of similar regions of Pall and Rim9p (Accession number U86641) and hydropathicity plot of Pall. A. Alignment. Residue numbering is given for each derived translation product. Identical residues are indicated by two dots and similar residues (A/G, D/E, F/Y/W, I/LM/V, K/R, N/Q and S/T) are indicated by one dot. Sequence alignments were performed using LALIGN (Huang and Miller, 1991). Horizontal lines indicate putative membrane-spanning segments for Rim9p (Li and Mitchell, 1997) and Pall. B. Hydropathicity plot (Kyte and Doolittle, 1982) of Pall.

given the very basic character of the long C-terminus of Pall (for residues 201–601, calculated $pI = 9.36$), which would by precedent (von Heijne, 1986; Boyd and Beckwith, 1989) suggest its cytosolic location, we would predict that the N-termini of hydrophobic segments 1 and 3 would point towards the cytosol, whereas those of hydrophobic segments 2 and 4 would point towards the exterior. This would place the mainly hydrophilic region between putative transmembrane domains 1 and 2 in the periplasm. In striking contrast to the very basic C-terminus, this hydrophilic region is very acidic (for residues 30–88, calculated $pI = 4.50$). The fact that in the *pal30* mutation a loss-of-function phenotype is caused by a (G47→D) substitution in this acidic, putative periplasmic loop within a group of seven contiguous residues highly conserved with Rim9p points to a functional role for this region.

We had previously observed that classical mutations in *pal* have a less extreme phenotype than those in the other five *pal* genes of the pH signal transduction pathway (Arst

et al., 1994). We have now shown that this is a general (i.e. locus-specific) feature of *pal* mutations because deletion of the entire *pal* coding region results in the same phenotype as the classical mutations. Moreover, one of the classical mutations is a frameshift that would lead to loss of the 538 C-terminal amino acids of the 601 residue Pall protein and would almost certainly be a null mutation.

Although the region of homology between Pall and Rim9p extends over most of 239 residue Rim9p protein, it does not extend to the very basic 400+ residue Pall C-terminus, whose role is an intriguing avenue for further investigation. In view of the homology of the zinc finger regions of PacC and Rim1p and of the similarities of their pH-dependent processing, Li and Mitchell (1997) queried whether *RIM* gene products acting upstream of Rim1p might be homologous to *pal* gene products. We have now shown this to be the case for Rim9p and Pall, both of which are required for normal processing of their corresponding transcription factors. The existence of possible homologues for the *pala*, *-B* and *-F* gene products among hypothetical *S. cerevisiae* proteins (Maccheroni et al., 1997; Negrete-Urtasun et al., 1997; Sorimachi et al., 1997) lends further credence to the hypothesis that the signalling pathways for PacC and Rim1p are conserved.

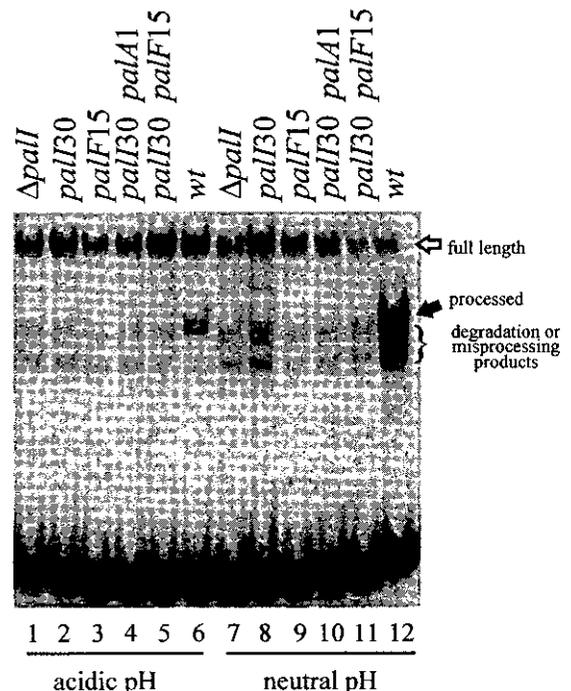


Fig. 3. pH-dependent processing of PacC protein is strongly reduced by *pal* mutations. Electrophoretic mobility shift assay was performed as described previously (Orejas et al., 1995). Full genotypes of strains: lanes 1 and 7, *yA2 pabaA1 pyrG89 Δpall::pyr4*; lanes 2 and 8, *pal30 glrA1 pantoB100 fwA1*; lanes 3 and 9, *yA2 pantoB100 palF15*; lanes 4 and 10, *wA3 pal30 palA1 pantoC3 cnxH4*; lanes 5 and 11, *biA1 pabaA1 pal30 sC12 cnxH4 spsA1 pantoB100 palF15*; lanes 6 and 12, *biA1*.

Experimental procedures

Strains and media

A. nidulans strains carried markers in standard use (Caddick *et al.*, 1986; Clutterbuck, 1993; Arst *et al.*, 1994). Standard media were used (Cove, 1966; Caddick *et al.*, 1986; Tilburn *et al.*, 1995).

pall cloning

Pools of linkage group III cosmids (Brody *et al.*, 1991) were co-transformed with an *argB*-containing plasmid (Johnstone *et al.*, 1985) into an *argB2 pall30 areA49 pantoB100 fwA1* strain. *argB*⁺ transformants were screened for the *pall*⁺ phenotype (Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994). Transformations were repeated until a single rescuing cosmid 29D02 was identified. Restriction fragment subclones were tested by the same co-transformation procedure. *pall* cDNA clones were isolated by screening a λ gt10 library (Osmani *et al.*, 1988).

Deletion of *pall*

A pBluescript SK+/- (lacking the *SacI* site in the polylinker) clone with the 4 kb *KpnI/SacII* fragment insert (Fig. 1) was used for gene replacement by substituting the 2.2 kb *SacI/HpaI* fragment [containing the entire coding region (Figs 1 and 2)] by the *pyr4* gene of *N. crassa* (obtained as a 2 kb *SmaI/PvuII* fragment from pRG1 (Waring *et al.*, 1989)). This plasmid was linearized with *KpnI* before transformation of a strain of genotype *yA2 pabaA1 pyrG89*. As *pyr4* complements *pyrG89*, *pyr*⁺ transformants were selected and screened for the *pall* mutant phenotype (Arst *et al.*, 1994). Gene replacement was confirmed by Southern blotting and genetic analysis.

Sequence analysis

The *pall* genomic sequence and mutant sequence changes were determined on both strands as described for *palB* (Denison *et al.*, 1995).

Electrophoretic mobility shift assay

The gel shift experiment was performed using acidic and neutral growth conditions and protein extraction as described previously (Orejas *et al.*, 1995). A 4% (w/v) polyacrylamide gel was used. Identification of the full-length and processed forms of the PacC protein was established by Orejas *et al.* (1995) using antibodies raised against bacterially expressed PacC proteins and extracts prepared from a variety of *pacC* mutants including a mutant deleted for the entire *pacC* coding region.

RNA isolation and Northern analysis

Northern blotting and preparation of RNA were performed as described previously (Tilburn *et al.*, 1995).

Acknowledgements

This work was supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (PO5554 and PO5893 to H.N.A.), the European Union (BIO4-CT96-0535 to M.A.P. and H.N.A.), the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (BIO97/0348 to M.A.P.), the National Science Foundation (RUI grant MCB-9722744 to S.H.D.) and the Howard Hughes Medical Institute Undergraduate Biological Sciences Education Program (71195-538901 to Mississippi College). J.-M.M. is the recipient of a fellowship from the Spanish Ministerio de Educación and E.A.E. holds an EMBO Fellowship. We thank Elaine Bignell and Elena Reoyo for technical assistance and Robert Hamilton for useful advice.

References

- Arst, H.N. Jr, Bignell, E., and Tilburn, J. (1994) Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **245**: 787-790.
- Boyd, D., and Beckwith, J. (1989) Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9446-9450.
- Brody, H.J., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., and Timberlake, W.E. (1991) Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **19**: 3105-3109.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G., and Arst, H.N. Jr (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **203**: 346-353.
- Clutterbuck, A.J. (1993) *Aspergillus nidulans*. In *Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes*, 3, 6th edn. O'Brien, S.J. (ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 3.71-3.84.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51-56.
- Denison, S.H., Orejas, M., and Arst, H.N. Jr (1995) Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* **270**: 28519-28522.
- Espeso, E.A., and Peñalva, M.A. (1996) Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem* **271**: 28825-28830.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr and Peñalva, M.A. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal biosynthetic gene. *EMBO J* **12**: 3947-3956.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Sánchez-Pulido, L., Brown, C.V., Valencia, A., Arst, H.N. Jr and Peñalva, M.A. (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* **274**: 466-480.
- von Heijne, G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* **5**: 3021-3027.
- Huang, X., and Miller, W. (1991) A time-efficient linear-space local similarity algorithm. *Adv Appl Math* **12**: 337-357.
- Johnstone, I.L., Hughes, S.G., and Clutterbuck, A.J. (1985) Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J* **4**: 1307-1311.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for

- displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105–132.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and growth. *Genetics* **145**: 63–73.
- MacCabe, A.P., Orejas, M., Pérez-González, J.A., and Ramón, D. (1998) Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J Bacteriol* **180**: 1331–1333.
- Maccheroni, W. Jr, May, G.S., Martinez-Rossi, N.M., and Rossi, A. (1997) The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**: 163–167.
- McCully, K.S., and Forbes, E. (1965) The use of *p*-fluorophenylalanine with 'master strains' of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genet Res* **6**: 352–359.
- Negrete-Urtasun, S., Denison, S.H., and Arst, H.N. Jr (1997) Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* **179**: 1832–1835.
- Orejas, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H.N. Jr and 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 Dev* **9**: 1622–1632.
- Osmani, S., Pu, R.T., and Morris, N.R. (1988) Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* **53**: 237–244.
- Shah, A.J., Tilburn, J., Adlard, M.W., and Arst, H.N. Jr (1991) pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 209–212.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328**: 721–732.
- Su, S.S.Y., and Mitchell, A.P. (1993a) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**: 67–77.
- Su, S.S.Y., and Mitchell, A.P. (1993b) Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3789–3797.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., et al. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**: 779–790.
- Waring, R.B., May, G.S., and Morris, N.R. (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-encoding genes. *Gene* **79**: 119–130.

Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* Gene Encoding a Novel Cytochrome P450 Monooxygenase Catalyzing Phenylacetate 2-Hydroxylation, Results in Penicillin Overproduction*

(Received for publication, December 24, 1998, and in revised form, February 4, 1999)

José Manuel Mingot, Miguel Angel Peñalva‡, and José Manuel Fernández-Cañón§

From the Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Velázquez 144, Madrid, 28006, Spain

Aspergillus nidulans utilizes phenylacetate as a carbon source via homogentisate, which is degraded to fumarate and acetoacetate. Mutational evidence strongly suggested that phenylacetate is converted to homogentisate through two sequential hydroxylating reactions in positions 2 and 5 of the aromatic ring. Using cDNA subtraction techniques, we have characterized a gene, denoted *phacA*, whose transcription is strongly induced by phenylacetate and which putatively encodes a cytochrome P450 protein. A disrupted *phacA* strain does not grow on phenylacetate but grows on 2-hydroxy- or 2,5-dihydroxyphenylacetate. Microsomal extracts of the disrupted strain are deficient in the NADPH-dependent conversion of phenylacetate to 2-hydroxyphenylacetate. We conclude that PhacA catalyzes the *ortho*-hydroxylation of phenylacetate, the first step of *A. nidulans* phenylacetate catabolism. The involvement of a P450 enzyme in the *ortho*-hydroxylation of a monoaromatic compound has no precedent. In addition, PhacA shows substantial sequence divergence with known cytochromes P450 and defines a new family of these enzymes, suggesting that saprophytic fungi may represent a source of novel cytochromes P450.

Phenylacetate is a precursor for benzylpenicillin production. *phacA* disruption increases penicillin production 3–5-fold, indicating that catabolism competes with antibiotic biosynthesis for phenylacetate and strongly suggesting strategies for *Penicillium chrysogenum* strain improvement by reverse genetics.

Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons by microbes involves the action of oxygenases (enzymes that incorporate one or two atoms from dioxygen into substrates) acting at two different levels in specific catabolic pathways (1, 2). First, oxygenase enzymes acting at the upstream segment of these pathways incorporate one (monooxygenases, aromatic ring hydroxylases) or two (aromatic ring dioxygenases) oxygen atoms into the aromatic substrate as hydroxyl groups, preparing the ring for a subsequent ring-opening step. In this second step, the

dihydroxylated aromatic ring is opened by ring-cleavage dioxygenases.

Monooxygenases are a mechanistically diverse group of enzymes (1) including, for example, flavoproteins such as *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (3), multicomponent enzymes such as *Pseudomonas mendocina* toluene 4-monooxygenase, in which one of the terminal hydroxylase polypeptides contains a binuclear iron cluster (4), or heme-containing cytochrome P450 systems. Monooxygenases of the cytochrome P450 superfamily (5, 6) are widely distributed among living organisms and catalyze a multiplicity of biosynthetic and catabolic reactions, usually with narrow substrate specificity, including the hydroxylation of a variety of lipophilic drugs.

In common with other saprophytic microbes, the genetically amenable, obligate aerobic fungus *Aspergillus nidulans* shows notable metabolic versatility. For example, it can use the aromatic hydrocarbon compound phenylacetate (PhAc)¹ as sole carbon source. Despite the abundant information available on the catabolic pathways of other aromatic compounds, which have been extensively studied in bacteria, our understanding of PhAc degradation pathways is scarce. In *Pseudomonas putida* U, it is known that PhAc is degraded through phenylacetyl-CoA (7), although the ring cleavage steps remain uncharacterized. In *A. nidulans*, PhAc degradation proceeds through 2,5-dihydroxy-PhAc (homogentisate, see Fig. 1). The three structural genes mediating the conversion of homogentisate to Krebs cycle intermediates (*i.e.* the “lower” PhAc pathway) have been characterized (8–10,) but the steps leading to homogentisate have not yet been reported. We describe here mutational and molecular analysis showing that *A. nidulans* PhAc catabolism proceeds via homogentisate through two sequential hydroxylating steps, of which the first is the 2-hydroxylation of the ring catalyzed by a novel cytochrome P450. Targeted inactivation of this gene results in penicillin overproduction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fungal Strains, Media, and Growth Conditions—*A. nidulans* strains carried markers in standard use (11). Standard media for *A. nidulans* (12) were used for strain maintenance, growth tests, and transformation. Complementation tests were carried out in constructed diploids.

A *biA1* strain was the source of cDNA, and a *biA1 methG1 argB2* strain was the recipient strain for *phacA* gene disruption. A *biA1 methG1* strain was used as wild type control in experiments with the disrupted strains. Culture conditions inducing high levels of expression of the PhAc catabolic genes have been described (13) and were used to grow mycelia for protein extraction. PhAc and its monohydroxy and dihydroxy derivatives were used as sole carbon source at 10 mM (although homogentisate was occasionally used at 25–50 mM), and 10 mM ammonium chloride was used as sole nitrogen source.

* This work was supported by Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Grants BIO94-932 and BIO97-348 and Antibióticos S. A. U. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AJ132442.

‡ To whom correspondence should be addressed. Fax: (34 91) 5627518; E-mail: cibp173@fresno.csic.es.

§ Present address: Dept. of Molecular and Medical Genetics, Oregon Health Sciences University, 3181 SW Sam Jackson Park Rd., L103 Portland, OR 97201-3098.

¹ The abbreviations used are: PhAc, phenylacetate; CYP, cytochrome P450; kbp, kilobase pair(s); HPLC, high performance liquid chromatography.

Isolation of PhAc Nonutilizing Mutants—2-, 3-, and 4-fluorophenylacetate at a 5 mM concentration were shown to prevent growth of *A. nidulans* in the presence of a derepressing carbon source, indicating that their catabolism was toxic for the mold. However, some residual growth was observed when plates were incubated for more than 3 days at 37 °C. Sectors of markedly more vigorous mycelia frequently arose after prolonged incubation. Although the reason why catabolism of these PhAc derivatives results in toxicity is not clear, preliminary tests showed that mutations preventing the toxicity of 2- and 3-fluorophenylacetate also prevented the catabolism of PhAc. Therefore, conidiospores of a *yA2 pantoB100* strain were plated to obtain isolated colonies, which were transferred to minimal medium with 0.05% lactose (w/v) as carbon source in the presence of 5 mM 2- or 3-fluorophenylacetate. Sectors with more vigorous growth were purified and tested for the utilization of different PhAc derivatives as sole carbon source. Two major classes were found, which were denoted class I and II (see "Results").

phacA Gene Disruption—A pUC18-based plasmid denoted pPhacA::argB was constructed by standard techniques. This plasmid contains (starting from the *lacZ* promoter in pUC18) 0.94 kbp of the *phacA* upstream region sequentially followed by its genomic coding region up to codon 297, a genomic, 3.2-kbp fragment containing an *argB*⁺ allele, the genomic sequence of *phacA* corresponding to codons 393–518, and finally 1.2 kbp of the *phacA* 3'-downstream region. This insert was purified from the plasmid after digestion with *EcoRI* and used for transformation (14). Transformed (arginine-independent) clones in which the resident *phacA* gene had been replaced by the transforming fragment were identified by Southern analysis. The mutated allele would encode a protein truncated at residue 297 and therefore would lack the predicted region involved in heme binding.

Characterization of phacA cDNA and Genomic Clones—*phacA* cDNA clones were obtained by differential screening of a cDNA library enriched in PhAc-induced transcripts, as described (8–10). Seven cDNA clones were obtained. The insert of one such clone was used to isolate genomic clones from a standard λ EMBL4 library. Cross-hybridizing sequences were mapped to two contiguous *Bam*HI fragments, 2.4 kb and 1.9 kb long (a *Bam*HI site was shown to split the *phacA* open reading frame). Nucleotide sequencing and comparison of genomic and cDNA clones revealed the intron-exon organization of the gene and showed that all seven cDNA clones were incomplete at the N-terminal coding region, the longest of which (at the 5'-end) ended within predicted codon 6. cDNAs including the predicted initiation codon were obtained by direct polymerase chain reaction amplification of the cDNA library using an internal *phacA* primer and *Agt10*-specific primers followed by a second polymerase chain reaction reaction primed with the above internal oligonucleotide and a second oligonucleotide ending 1 nucleotide upstream of the ATG codon. The presence of the ATG codon in the resulting cDNA product (and the absence of introns between codons 1 and 6) was confirmed by sequencing.

Preparation of Microsomes and Enzyme Assays—Mycelia from the isogenic Δ *phacA* and *phacA* strains were pregrown in glucose minimal medium, washed, transferred to 10 mM PhAc minimal medium, and incubated for an additional 4 h at 37 °C to induce transcription of genes for PhAc catabolism (13). Cells were collected by filtration, washed, resuspended in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and disrupted with a glass bead beater (Braun, 0.5-mm glass beads) at 4 °C. Crude extracts were clarified after centrifugation at 22,000 $\times g$ for 15 min. Microsomal pellets were recovered after centrifugation at 100,000 $\times g$ for 1 h and resuspended in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. These extracts contained 1–4 mg/ml protein. Enzyme activities of the microsomal extract were determined using standard procedures (15, 16) with minor modifications. NADPH-cytochrome P450 reductase was assayed in 1-ml reactions at 25 °C with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, following the NADPH-dependent reduction of cytochrome *c* (0.05 mM initial concentration; $\epsilon^{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) or ferricyanide (0.5 mM initial concentration; $\epsilon^{420} = 1.02$) by the decrease of absorbance at 550 nm and 420 nm, respectively.

PhAc 2-hydroxylase was assayed by measuring the formation of 2-hydroxy-PhAc in a reaction that required PhAc (added at 1 mM) and NADPH (also at 1 mM) in the presence of a microsomal fraction. 2-Hydroxy-PhAc was chemically determined using diazotized 4-nitroaniline essentially as described (17). Absorbance was read at 550 nm and converted to nmol of 2-hydroxy-PhAc using a reference plot. The range of linear response was 1–100 nmol of 2-hydroxy-PhAc. This method also detected 3-hydroxy-PhAc, and therefore, the identity of the reaction product as 2-hydroxy-PhAc was confirmed by direct HPLC analysis of the reaction mixtures (see "Results"). Proteins were precipitated in the presence of 5% (w/v) trichloroacetic acid, and 10 μ l samples were in-

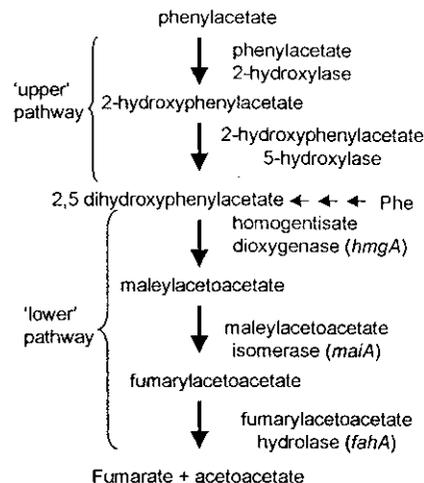


FIG. 1. The *A. nidulans* phenylacetate degradation pathway. Shown are the steps required for PhAc degradation to Krebs cycle intermediates. Enzymes in the upper pathway are specific for PhAc. Enzymes in the lower pathway (gene names italicized) are common to PhAc and Phe/Tyr catabolism (indicated with horizontal arrows). Phe and Tyr are also degraded through homogentisate.

jected into a Nucleosil 300–5 C18 column (250 \times 4 mm) coupled to a 11 \times 4-mm precursor column of this support, using as mobile phase (at 0.6 ml/min) a solution containing 50 mM monohydrogen potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 100 mM trifluoroacetic acid, and 8% (v/v) acetonitrile. Detection was at 220 nm.

Penicillin Production—Cultures for penicillin production were inoculated with spores of the Δ *phacA* or the *phacA*⁺ strain in penicillin production broth (18) with 2% lactose as the main carbon source, 2.5% (w/v) corn steep liquor, and the indicated concentrations of sodium phenylacetate. Flasks were shaken at 250 rpm at 37 °C. Samples were taken at different time points and used to measure penicillin using a bioassay with *Micrococcus luteus*, with penicillin G as standard (18).

RESULTS

The "Upper" Phenylacetate Degradation Pathway—We found that 2-, 3-, or 4-fluoro-PhAc prevents *A. nidulans* growth on 0.05% (w/v) lactose as carbon source. We therefore selected mutations resulting in fluorophenylacetate resistance, assuming that they would prevent PhAc utilization and following Apirion (19), who used fluoroacetate resistance to select acetate nonutilizing mutants. Mutations preventing PhAc utilization (*phac*) were efficiently selected with 2-fluorophenylacetate. They were recessive in diploids, indicating that they represent loss-of-function mutations. They were classified in two major classes. Class I mutants did not grow on PhAc but grew on 2-hydroxy-PhAc or 2,5-dihydroxy-PhAc. By contrast, class II mutants did not grow on either PhAc or 2-hydroxy-PhAc but grew on 2,5-dihydroxy-PhAc. Class I or II mutations did not affect growth on acetate, Phe, Tyr, 3- or 4-hydroxy-PhAc, and 3,4-dihydroxy-PhAc, showing that they specifically prevented PhAc catabolism. Mutations in class I complemented class II mutations. As 2,5-dihydroxy-PhAc is known to be an intermediate of PhAc catabolism (8–10), these data are consistent with the pathway shown in Fig. 1 in which PhAc is converted into homogentisate through two hydroxylating reactions, prevented by class I and class II mutations, respectively.

Molecular Cloning of phacA, a Gene Encoding a Novel Cytochrome P450—We have previously used a differential screening procedure of a subtracted cDNA library to isolate cDNA clones representing transcripts induced by PhAc (8–10). This collection of cDNAs included clones for the three genes (*fahA*, *maiA*, and *hmgA*) of the lower PhAc pathway (Fig. 1; Refs. 8–10). Among the remaining cDNA clones, those that did not represent these previously described genes were identified and classified by restriction enzyme mapping and/or partial cDNA

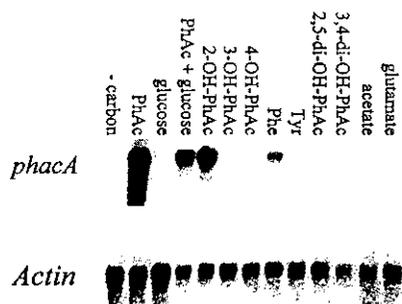


FIG. 2. Northern analysis of *phacA* transcript levels. Cells were grown on minimal medium with 0.3% (w/v) glucose as sole carbon source for 16 h at 37 °C and transferred to media with the indicated carbon sources (glucose at 1% (w/v), all aromatic compounds, and glutamate at 10 mM and potassium acetate at 30 mM; *-carbon* indicates no carbon source added). These secondary cultures were incubated for a further 1 h at 37 °C. Mycelia were then harvested and used to isolate RNA (18). The probe was a 1.2 kb *phacA* cDNA clone (4FG4). Actin transcript was used as loading control.

sequencing. Seven overlapping cDNAs represented a novel PhAc-induced transcript whose gene was named *phacA* and which contained an open reading frame putatively encoding a 518-residue polypeptide (M_r 58,495). DNA sequencing of genomic clones showed that the *phacA*-coding region is interrupted by three introns, 65, 56, and 53 nucleotides long. The nucleotide sequence of *phacA* and the amino acid sequence of its derived protein product have been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank data bases under accession number AJ132442. Blastp searches against non-redundant Swissprot+Translation of EMBL nucleotide sequence data bases revealed that all 20 entries showing the highest amino acid sequence identity to PhacA were cytochrome P450 proteins of the CYP1 family (of which 19 were CYP1A1 P450s), including mammalian and fish proteins but only a single human CYP. Identity levels were in the 25% range, with the highest identity (27.4% in a 465 residue overlap) shown by a *Sparus aurata* (gilthead sea bream) P450 protein. Cytochromes P450 are heme-thiolate enzymes, and PhacA residues 431 to 439 contain the peptide motif Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Gly (where Xaa indicates any amino acid), which is involved in heme binding in proteins of this class (6). We conclude that *phacA* encodes a cytochrome P450. The above levels of identity are below those required to place it in an already existing family (>40% identity required (5)). Therefore, PhacA defines a new family of these proteins.² It has been denoted CYP504 using the current P450 nomenclature system.

***phacA* Is Strongly Induced by Phenylacetate**—*phacA* transcript levels were analyzed by Northern analysis in cells grown in glucose and subsequently transferred to minimal media, each containing a different carbon source. This analysis (Fig. 2) showed that *phacA* transcription is strongly induced by PhAc and largely repressed by glucose (PhAc plus glucose, Fig. 2). The transcript was absent in cells transferred to glucose alone or to gluconeogenic substrates acetate or glutamate. 2-Hydroxy-PhAc was also a strong inducer (although less so than PhAc), and 3-hydroxy-PhAc was a weak inducer. 4-Hydroxy-PhAc, 2,5-, or 3,4-dihydroxy-PhAc did not induce *phacA* transcription. Notably, Phe (but not Tyr) induced *phacA* transcription to some extent. These results support the contention that *phacA* is involved in PhAc catabolism.

The Phenotype of a Disruption Strain Is Consistent with *phacA* Encoding a PhAc 2-Hydroxylase—To confirm the involvement of PhacA in PhAc catabolism, we constructed a disruption-deletion *phacA* mutation by reverse genetics. We transformed an *argB2* arginine-requiring strain with a linear DNA fragment carrying a mutated *phacA* gene in which a

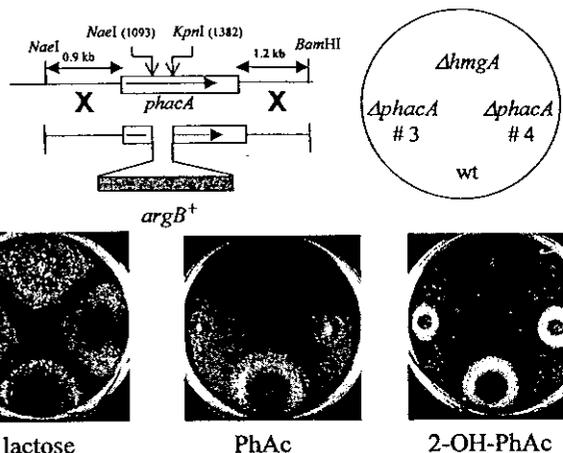


FIG. 3. Disruption of *phacA*. The *phacA* gene was replaced by a mutant version after transformation with a linear DNA fragment in which *phacA* codons 298–392 had been replaced by a 3.2-kbp DNA fragment containing the *argB*⁺ gene (see "Experimental Procedures"). This mutant allele encodes a PhacA protein truncated after residue 297. Two transformants (denoted $\Delta phacA$ #3 and #4) carrying the expected disruption-deletion mutation were purified and tested for growth on minimal medium with 0.05% (w/v) lactose, 10 mM PhAc, or 10 mM 2-hydroxy-PhAc as sole carbon source, as indicated. A wild type strain and a strain carrying a null ($\Delta hmgA$) mutation in the homogentisate dioxygenase gene (see Fig. 1) were used as controls. Plates were incubated for 4 days at 37 °C before being photographed.

3.2-kbp fragment containing an *argB*⁺ allele replaced a 289-base pair *NaeI*-*KpnI* *phacA* genomic fragment including codons 298–392 (see Fig. 3). This mutant *phacA* gene would encode a PhacA protein truncated at residue 297 and therefore lacking the 221 C-terminal residues, which include the essential Cys-containing peptide motif involved in heme binding. Homokaryotic transformant clones were purified after repeated streaking on medium lacking arginine and analyzed by Southern blot hybridization. Two transformants showing an identical hybridization pattern consistent with the integration event shown in Fig. 3 were chosen for further analyses. Both grew normally on 0.05% (w/v) lactose but, in contrast to the wild type, showed residual growth (similar to that observed in the absence of a carbon source) on PhAc-minimal medium (Fig. 3), showing that PhacA is indeed involved in PhAc catabolism. By contrast, both transformants were able to grow on 2-hydroxy-PhAc (Fig. 3). These data indicate that PhacA is involved in the *ortho*-hydroxylation of PhAc. The disruption-deletion mutation (denoted $\Delta phacA$) was recessive in diploids (in agreement with its predicted loss-of-function phenotype) and did not complement *phac-4*, a prototype of classical class I mutations that, in common with $\Delta phacA$, leads to inability to use PhAc but allows growth on 2-hydroxy-PhAc. *phac-4* is therefore a *phacA* allele that we renamed *phacA4*.

$\Delta phacA$ Microsomes Are Deficient in P450 PhAc 2-Hydroxylating Activity—Most eukaryotic cytochromes P450 are microsomal enzymes. Electrons are transferred to their catalytic heme center from (NADPH)-cytochrome P450 reductase, a microsomal enzyme containing FAD and FMN (see Fig. 4A). We prepared microsomal fractions from wild type and $\Delta phacA$ cells induced with PhAc, which showed similar (NADPH)-cytochrome P450 reductase activity, as assayed by the NADPH-dependent reduction of artificial electron acceptors such as ferricyanide or cytochrome *c* (20) (Fig. 4A). The corresponding *phacA*⁺ and $\Delta phacA$ soluble fractions showed similar, high levels of homogentisate dioxygenase (a soluble enzyme of the PhAc degradation pathway, data not shown), indicating the equivalent induction of PhAc catabolism in both strains.

Following incubation *in vitro* of wild type microsomes with

² David R. Nelson, personal communication.

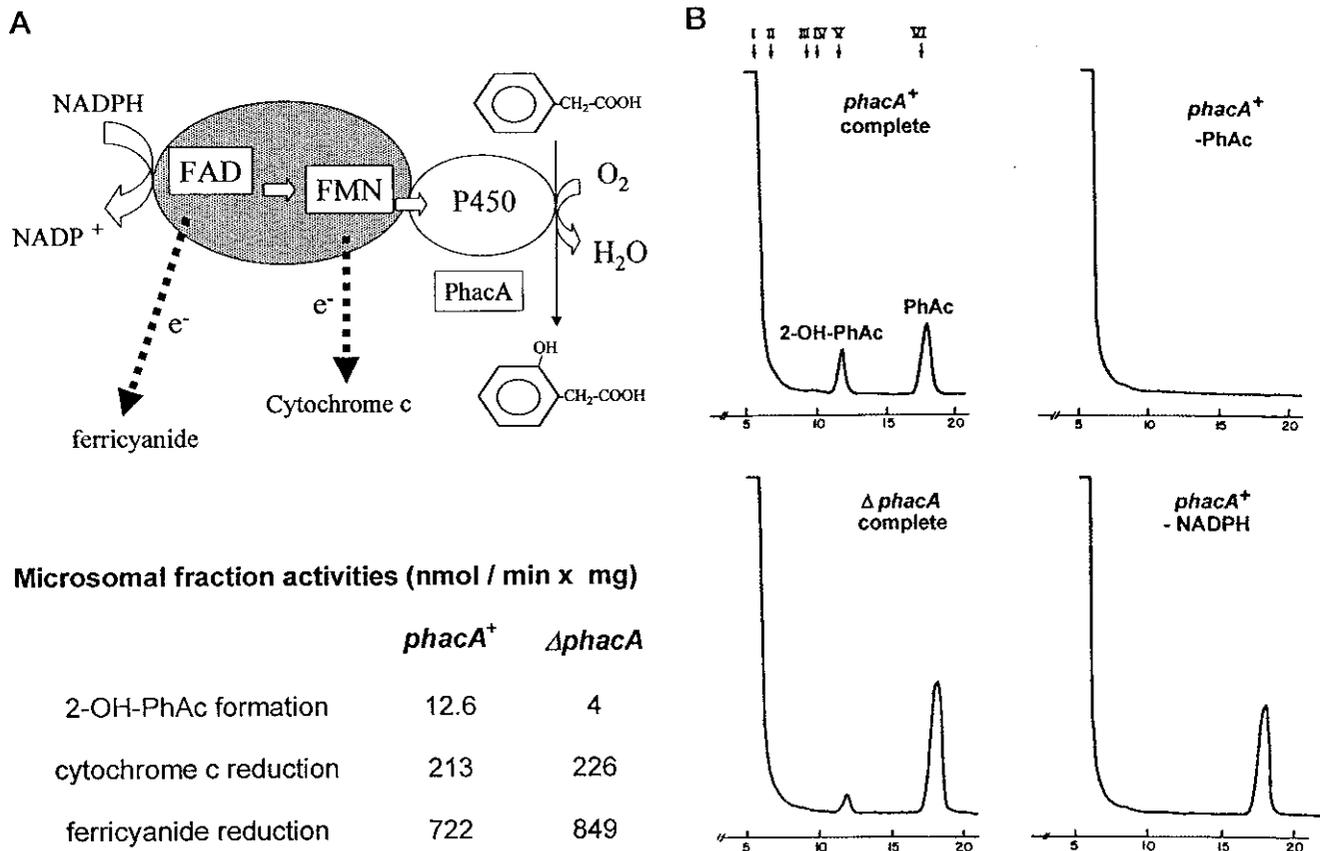


FIG. 4. *phacA* disruption results in a marked reduction of microsomal PhAc 2-hydroxylase activity. **A**, a cytochrome P450 monooxygenase catalyzes the incorporation of one of the atoms from dioxygen (as an hydroxyl group) into the aromatic ring of PhAc. The source of electrons for such reaction is a NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, an enzyme that transfers electrons from NADPH through two flavin redox centers (20). *In vitro*, the activity of the reductase can be monitored by using artificial electron acceptors such as ferricyanide and cytochrome c, as indicated. Shown below are PhAc 2-hydroxylase and NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase activities in the microsomal fractions of Δ *phacA* and *phacA*⁺ mycelia. Formation of 2-hydroxy-PhAc was monitored with a chemical method (17). **B**, HPLC analysis of PhAc 2-hydroxylase in the above microsomal fractions. The positions of standards were indicated by roman numbers as follows: I, 2,5-dihydroxy-PhAc; II, 3,4-dihydroxy-PhAc; III, 4-hydroxy-PhAc; IV, 3-hydroxy-PhAc; V, 2-hydroxy-PhAc; VI, PhAc. The retention time for authentic 2-hydroxy-PhAc was 11.82 min, whereas the product formed in the complete *phacA*⁺ and Δ *phacA* reactions showed retention times of 11.81 and 11.86 min, respectively.

PhAc and NADPH, we detected the formation of a monohydroxylated PhAc derivative using a chemical detection method (Fig. 4A; see "Experimental Procedures"). Direct HPLC analysis of the reaction mixture showed that this compound was 2-hydroxy-PhAc and that its formation was absolutely dependent on the presence of both PhAc and NADPH (Fig. 4B). This showed that *A. nidulans* microsomes contain a phenylacetate *ortho*-hydroxylating activity. This activity was markedly and reproducibly reduced but not abolished by the Δ *phacA* mutation (Fig. 4, A and B). Finally, wild type mycelia pregrown in glucose and transferred to media containing PhAc secreted 2-hydroxy-PhAc to the culture supernatant (Fig. 5). In agreement with the above *in vitro* assays, secretion of 2-hydroxy-PhAc was also markedly reduced, but not abolished, by the Δ *phacA* mutation (Fig. 5). All these data, together with the growth characteristics of the Δ *phacA* strain (see above), strongly support the conclusion that *phacA* encodes a phenylacetate 2-hydroxylase and that a second, minor enzyme showing this activity is present in *A. nidulans* microsomes (see "Discussion").

***phacA* Disruption Results in Increased Penicillin Production**—Penicillin-producing filamentous fungi use PhAc (activated as a CoA thioester) as a precursor for penicillin G biosynthesis. PhAc is exchanged with the L-aminoadipyl moiety of isopenicillin N to yield penicillin G in a reaction catalyzed by acyl-CoA:isopenicillin N-acyltransferase (see Ref. 21 for review). PhAc cannot be synthesized by fungi, and therefore it

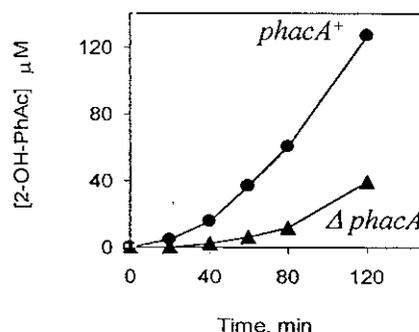


FIG. 5. **Reduced secretion of 2-hydroxyphenylacetate in a Δ *phacA* strain.** Culture supernatants of *phacA*⁺ (circles) and Δ *phacA* (triangles) strains were assayed for the presence of 2-hydroxy-PhAc. Mycelia were pregrown in glucose minimal medium and transferred to PhAc. Samples were taken at the indicated time-points after the transfer.

has to be fed to penicillin cultures. We reasoned that the PhAc degradation pathway would compete with the penicillin biosynthetic pathway for PhAc, suggesting that interrupting the initial step of the degradation pathway may improve the incorporation of PhAc into penicillins. This prediction was confirmed with the two above Δ *phacA* strains, which in independent experiments reproducibly showed a marked elevation in penicillin production over the wild type. Fig. 6 shows one such

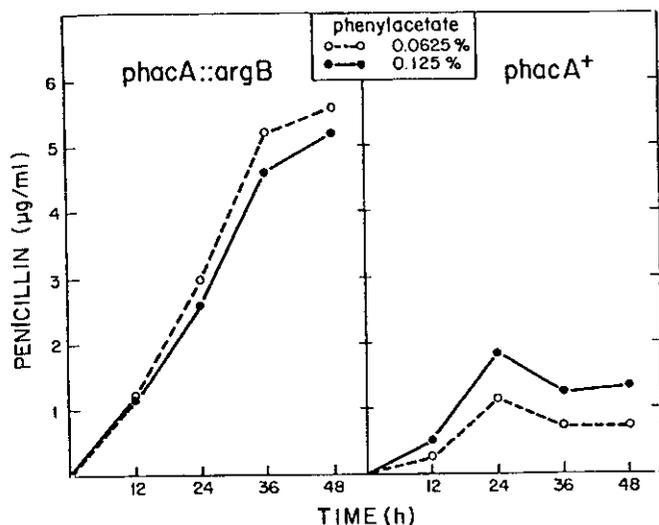


FIG. 6. Increased penicillin production resulting from *phacA* disruption. Time course of penicillin production in a $\Delta phacA$ (denoted here as *phacA::argB*) and a *phacA*⁺ strain. Media contained the indicated PhAc concentrations. PhAc is used as side-chain precursor for penicillin G biosynthesis (see text). Shown are data for transformant #3. Data for transformant #4 (not shown) were nearly indistinguishable in this and other penicillin production experiments.

experiment, illustrating how the increase is already evident in cultures supplemented with 0.125% (w/v) PhAc (1.8 µg/ml in the wild type, 5.2 µg/ml in the $\Delta phacA$ strain). Moreover, reduction of PhAc to 0.0625% (w/v) resulted in nearly a 40% decrease in wild type penicillin production but had no decreasing effect in mutant strain production (Fig. 6; for simplicity, results with only one of the two disrupted strains are shown; see the legend). Under such conditions, the $\Delta phacA$ mutation resulted in a 4.9-fold increase in penicillin production.

DISCUSSION

We have analyzed the "upper pathway" of PhAc catabolism (i.e. the conversion of PhAc to homogentisate, Fig. 1) in the filamentous fungus *A. nidulans*. Mutational and molecular evidence strongly indicates that this conversion proceeds via two sequential hydroxylating steps, the first of which is a 2-hydroxylation of the aromatic ring catalyzed by a cytochrome P450 monooxygenase encoded by the *phacA* gene. First, we have isolated a class of mutations preventing growth on PhAc but allowing growth on 2-hydroxy-PhAc or homogentisate as sole carbon source. Second, we describe a gene, denoted *phacA*, whose inactivation results in the same phenotype as the above mutations. This $\Delta phacA$ mutation does not complement with a prototypical classical mutation of the above class, indicating that both affect the same gene. Third, *phacA* encodes a CYP (cytochrome P450 monooxygenase). CYP enzymes are usually involved in a variety of biosynthetic and catabolic hydroxylating reactions (5, 6), in agreement with the predicted PhAc function. Fourth, *phacA*⁺ microsomal extracts catalyze the PhAc- and NADPH-dependent synthesis of 2-hydroxy-PhAc. By contrast, a mutant $\Delta phacA$ microsomal fraction is markedly deficient in this reaction. An *A. niger* microsomal, NADPH-dependent phenylacetate-2-monooxygenase activity previously reported by others (17) is possibly encoded by a *phacA* homologue. In agreement with our Northern analysis, such activity was detected in phenylacetate-grown cells and absent from glucose-grown cells (17).

The $\Delta phacA$ mutation constructed here is almost certainly a null mutation, which strongly suggested that the residual PhAc 2-hydroxylase activity that we detected with $\Delta phacA$ microsomal extracts is encoded by a different gene. We have identified

the gene (denoted *pshA*) encoding this minor activity.³ In agreement with our prediction, a double $\Delta phacA \Delta pshA$ mutation abolished microsomal PhAc 2-hydroxylation.³ A $\Delta pshA$ strain grows on PhAc but does not grow on 3-hydroxy-PhAc (which in the wild type is also catabolized through homogentisate), indicating that *pshA* encodes a 3-hydroxy-PhAc 6-hydroxylase (i.e. and *ortho*-hydroxylase), converting 3-hydroxy-PhAc to 2,5-dihydroxy-PhAc. This enzyme has been previously described in the fungus *Trichosporum cutaneum*, which converts PhAc to homogentisate through sequential hydroxylation of positions 3 and 6 of the ring (22).

Higher eukaryotes have multiple cytochrome P450 monooxygenases catalyzing a variety of oxidative reactions. Such abundance is not found in the microbial world. For example, only three CYP genes are found in the genome of *S. cerevisiae* (23). The marked metabolic versatility of filamentous fungi would suggest a greater variety of CYP enzymes in their proteomes. In addition to *phacA*, four *stc* genes of the *A. nidulans* sterigmatocystin biosynthetic cluster encode CYP enzymes (24). The closely related organism *A. niger* has a very specific benzoate-4 hydroxylase enzyme, encoded by the *bpha* gene (25). Notably, PhAc and BphAc each define a new CYP family, suggesting that metabolically versatile saprophytic fungi may represent an as yet unexplored source of variability for CYP enzymes catalyzing novel metabolic reactions.

Industrial penicillin production by *Penicillium chrysogenum* strains requires the addition of PhAc, which is the side-chain precursor for the synthesis of penicillin G. Part of the added PhAc is oxidized (26), and it is not transformed into penicillin. Therefore, strain improvement programs using mutation and selection techniques have been directed to prevent such oxidation (27). Engineered expression in *P. chrysogenum* of a bacterial phenylacetyl-CoA ligase leading to increased levels of phenylacetyl-CoA available for penicillin biosynthesis resulted in penicillin overproduction (28). We show here that targeted disruption of the gene mediating the first step of *A. nidulans* PhAc catabolism results in a 3- to 5-fold increase in penicillin production and makes the recombinant strain less dependent on the external supply of PhAc. This presumably results from increased availability of phenylacetate for penicillin G biosynthesis. A *P. chrysogenum phacA* homologue has been identified. Therefore, these results pave the way for the improvement of *P. chrysogenum* industrial strains using a similar methodology.

Acknowledgments—We thank E. Reoyo for technical assistance, Brian Nowak-Thompson, Eduardo Diez, and José Luis García for critical reading of the manuscript, Beatriz Galán and Auxi Prieto for their advice with HPLC analysis, and David R. Nelson for his assignment of an standardized cytochrome P450 designation to PhAc.

REFERENCES

- Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E. L. (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565–601
- Harayama S., and Timmis K. N. (1992) in *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel H., and Sigel A., eds) pp. 99–155, Marcel Dekker Inc., New York
- Schreuder, H. A., Prick, P. A., Wierenga, R. K., Vriend, G., Wilson, K. S., Hol, W. G., and Drenth, J. (1989) *J. Mol. Biol.* **208**, 679–696
- Whited, G. M., and Gibson, D. T. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 3010–3016
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996) *Pharmacogenetics* **6**, 1–42
- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 945–993
- Olivera, E. R., Minambres, B., García, B., Muñoz, C., Moreno, M. A., Fernández, A., Díaz, E., García, J. L., and Luengo, J. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6419–6424.
- Fernández-Cañón, J. M., and Peñalva, M. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9132–9136
- Fernández-Cañón, J. M., and Peñalva, M. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21199–21205
- Fernández-Cañón, J. M., and Peñalva, M. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 329–337

³ J. M. Mingot, M. A. Peñalva, and J. M. Fernández-Cañón, unpublished results.

11. Clutterbuck, A. J. (1993) in *Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes* (O'Brien, S. J., ed) pp. 3.71-3.84, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
12. Cove, D. J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 51-56
13. Fernández-Cañón, J. M., and Peñalva, M. A. (1997) *Anal. Biochem.* **245**, 218-221
14. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., and Davies, R. W. (1983) *Gene* **26**, 205-211
15. Strobel, H. W., and Dignam, J. D. (1978) *Methods Enzymol.* **52**, 89-96
16. Benveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M. P., and Durst, F. (1989) *Biochem. J.* **259**, 847-853
17. Sugumaran, M., and Vaidyanathan, C. S. (1979) *FEMS Microbiol. Lett.* **5**, 427-430
18. Espeso, E. A., and Peñalva, M. A. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 1457-1465
19. Apirion, D. (1965) *Genet. Res.* **6**, 317-329
20. Vermillion, J. L., and Coon, M. J. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8812-8819
21. Luengo, J. M., and Peñalva, M. A. (1994) in *Aspergillus: 50 Years On* (Martinelli, S. D., and Kinghorn, J. R., eds) pp. 603-638, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
22. Anderson, J. J., and Dagley, S. (1980) *J. Bacteriol.* **141**, 534-543
23. van den Brink, H. M., van Gorcom, R. F., van den Hondel, C. A., and Punt, P. J. (1998) *Fungal Genet. Biol.* **23**, 1-17
24. Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H., and Leonard, T. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1418-1422
25. van Gorcom, R. F., Boschloo, J. G., Kuijvenhoven, A., Lange, J., van Vark, A. J., Bos, C. J., van Balken, J. A., Pouwels, P. H., and van den Hondel, C. A. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223**, 192-197
26. Hockenhull, D. J. D., Walker, A. D., Wilkin, J. D., and Winder, F. G. (1951) *Biochemistry* **50**, 605-609
27. Lein, J. (1986) in *Overproduction of Microbial Metabolites* (Vanek, Z., and Hostalek, Z., eds) pp. 105-139, Butterworths, Stoneham, MA
28. Minambres, B., Martínez Blanco, H., Olivera, E. R., Garcia, B., Diez, B., Barredo, J. L., Moreno, M. A., Schleissner, C., Salto, F., and Luengo, J. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33531-33538