



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

KIMIKA ZIENTZIEN FAKULTATEA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

**Facultad de Ciencias Químicas/Kimika Zientzien
Fakultatea**

Grado en Química

TRABAJO FIN DE GRADO

**Identificación del factor de transcripción MacA, regulador
de los genes de importación de cobre en *Aspergillus
nidulans*.**

Autor/a: Amaia Vertiz Gaztelumendi

Dirigido por: Unai Ona Ugalde y Ane Marquina Iñarrairaegui

San Sebastián, Junio de 2017

GIPUZKOAKO CAMPUSA
CAMPUS DE GIPUZKOA
Pº. Manuel de Lardizabal, 3
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN
GIPUZKOA

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	3
1.ABSTRACT	3
2.INTRODUCCIÓN	4
2.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	4
2.2 HOMEOSTASIS DEL COBRE	5
3.MATERIALES Y METODOS.....	8
3.1 MATERIALES	8
3.1.1 Cepas y plásmidos	8
3.1.2 Oligonucleótidos	9
3.1.2 Medios de cultivo y características	10
3.2 MÉTODOS.....	12
3.2.1 Construcción de cepas	12
3.2.2 Análisis de sensibilidad de la cepa $\Delta macA$ al BCS y al cobre.....	15
3.2.3 Extracción de ADN.....	15
3.2.4 Extracción de proteína	16
3.2.5 Southern-Blot	16
3.2.6 Western-Blot	17
3.3 KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	19
4.RESULTADOS.....	20
4.1 IDENTIFICACIÓN DE MacA.....	20
4.2 CARACTERIZACIÓN DE MacA.....	24
4.2.1 Generación de la cepa mutante $\Delta macA$ (BD1077)	24
4.2.2 Estudio de funcionalidad.....	27
4.3 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MacA	29
5.DISCUSIÓN	31
6.CONCLUSIONES.....	33
6.CONCLUSIONS	33
7.ANEXO TÉCNICO	34
Conceptos.....	34
Esquema del procedimiento experimental.....	37
BIBLIOGRAFÍA	38

1.RESUMEN

El cobre es un elemento esencial para todo organismo ya que participa en numerosos procesos biológicos fundamentales. Aun así, las altas concentraciones de cobre resultan ser tóxicas. Es por esto, que los organismos han desarrollado mecanismos que controlan las concentraciones intracelulares de cobre frente a cambios externos.

La importación y detoxificación del cobre son dos de los procesos centrales en la homeostasis. Las proteínas involucradas en estos procesos son reguladas por factores de transcripción. Mientras que en *S. cerevisiae* y *C. albicans* existen dos factores de transcripción que regulan independientemente cada proceso, *C. neoformans* y *S. pombe* poseen un único regulador que controla ambos procesos (Nevitt *et al.*, 2012;Peña *et al.*, 1998).

Aspergillus nidulans es una de las especies mejor caracterizadas del grupo de los hongos filamentosos, un grupo importante de microorganismos, entre los que se encuentran especies patógenas de interés agrícola, alimentario y clínico. Martzel Antsoategi, miembro del grupo, ha demostrado la existencia en *Aspergillus nidulans* de un factor de transcripción denominado AceA, encargado de regular el principal detoxificador de cobre, la ATPasa de membrana CrpA. Sin embargo, hasta este Trabajo de Fin de Grado, nada se sabía acerca de la regulación de la internalización celular de cobre en *Aspergillus nidulans*.

En éste trabajo se ha identificado y caracterizado un segundo factor de transcripción en *A. nidulans*, MacA, encargado de regular el proceso de importación de cobre.

1.ABSTRACT

Copper is an essential element for all organisms because it takes part in basic biological process. Even so, high concentrations of this metal are toxic. Therefore, organisms have developed mechanisms that control the intracellular concentrations to compensate external changes.

The uptake and the detoxification of copper are two of the central process of the homeostasis. The proteins involved in those are regulated by transcription factors. While *S. cerevisiae* and *C. albicans* have two transcription factors that regulate independently each process, *C. neoformans* and *S. pombe* have only one transcription factor that controls both(Nevitt *et al.*, 2012;Peña *et al.*, 1998).

Aspergillus nidulans is one of the best characterized species of the filamentous ascomycetes, an important group of microorganisms, which include pathogenic species of agricultural, food or clinical interest. Martzel Antsoategi, a member of the research group, has demonstrated the existence in *A. nidulans* of one transcription factor named AceA, responsible for the regulation of the principal detoxification process of copper, the membrane ATPase CrpA. However, until this study, regulation of copper uptake had not been described in this organism.

In this study, a second transcription factor it has been identified and characterized in *A. nidulans*, MacA, that regulates the uptake of copper.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Todas las células de un mismo individuo contienen el mismo material genético, pero no todas las células son iguales. Esto se debe a que no todos los genes están activos al mismo tiempo. Las células necesitan adaptarse a su entorno constantemente y para ello modifican el patrón de la expresión de los genes. Para que se pueda dar esta modulación de la expresión es necesaria la presencia de dos elementos. Por un lado, es necesaria la presencia de secuencias específicas reguladoras en el promotor del gen. Por el otro, son necesarias proteínas capaces de direccionar la expresión de los genes. Estas proteínas maestras de la regulación de la expresión génica se denominan factores de transcripción (FT).

Existen dos tipos de factores de transcripción, los basales y los regulatorios:

- Los factores de transcripción basales/generales son aquellos que regulan la expresión de todos los genes del genoma y están presentes en todas las células al mismo tiempo. Por ejemplo, TFIIA, TFIIB etc., (reconocen la caja TATA).
- Los factores de transcripción regulatorios/específicos son aquellos que regulan (activan o reprimen) un gen específico del genoma tras activarse mediante la percepción de cambios ambientales. De esta forma, la célula responde sintetizando nueva proteína o inhibiendo su síntesis, según las necesidades del momento. Los FT que se describen en este Trabajo de Fin de Grado pertenecen a este grupo de factores de transcripción.

Los factores de transcripción contienen uno o más dominios de unión a DNA (DNA binding domain), los cuales reconocen secuencias específicas en el promotor. Por ejemplo, el factor de transcripción específico que regula la importación de cobre en *A. fumigatus*, AfMacA, contiene un "Copper-fist DNA binding domain" que reconoce la secuencia denominada Copper Responsive element (5'-A(A/C)T(C/G)TGCTCA-3') en el promotor de los importadores de alta afinidad de cobre de la familia Ctr. Una vez el FT se ha unido al ADN, el complejo actúa como una plataforma de ayuda para la fijación de la enzima ARN polimerasa, necesaria para la transcripción. La transcripción es el proceso por el cual la información genética del ADN es transcrita a ARN mensajero (ARNm), mientras que mediante la traducción, el ARNm es procesado a proteína.

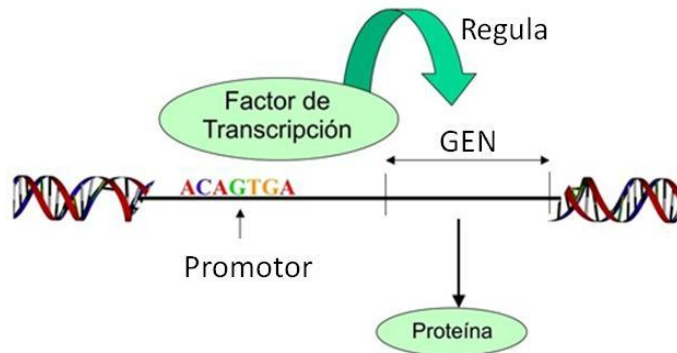


Figura 1. Esquema de los elementos básicos del proceso de la transcripción: la secuencia de reconocimiento del promotor para la unión del factor de transcripción y señal para la ARN polimerasa II. Todo esto regula la expresión del gen, que a su vez determina la expresión de una proteína. Imagen obtenida en <https://unidoscontradeficienciagata2.com>

2.2 HOMEOSTASIS DEL COBRE

El cobre (Cu) es un elemento esencial para la vida. Es un cofactor indispensable de diversas proteínas como el citocromo c oxidasa (encargado de la respiración celular), superóxido dismutasa (encargado de neutralizar los radicales de hidroxilo causantes de daños celulares), etc., (Balamurugan and Schaffner, 2006; Nevitt *et al.*, 2012; Peña *et al.*, 1998). Sin embargo, la acumulación de cobre tiene efectos tóxicos. El cobre en altos niveles participa en reacciones Fenton en las que se producen radicales altamente reactivos causantes de daños celulares tales como, la oxidación de proteínas, ruptura de ADN o ARN y daño de membrana a causa de la superoxidación de lípidos. El Cu también puede reemplazar a distintos cofactores de diversas metaloproteínas como el Zinc (Balamurugan and Schaffner, 2006; Peña *et al.*, 1998).

Por esta razón los organismos necesitan controlar los niveles de cobre intracelulares entre el cobre necesario para el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos y el nivel tóxico del ion. Para ello, los organismos han desarrollado mecanismos que controlan tanto la importación como la detoxificación del cobre.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo en el cual la homeostasis del cobre se ha estudiado con mayor profundidad. Este organismo consta de dos factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los genes que participan en la homeostasis del cobre, ScMac1p y ScAce1p. A niveles nutricionales de cobre, ScMac1p activa la expresión de los genes codificantes de los **transportadores de membrana de alta afinidad** (ScCTR1 y ScCTR3), cuya función es la de importar Cu(I) (Peña *et al.*, 1998). Asimismo, induce la expresión de la Cu(II)/Fe(III) reductasa codificada por el gen ScFRE1 (Jungmann *et al.*, 1993; Peña *et al.*, 1998). Esta metalorreductasa se sitúa en la superficie celular y se encarga de reducir Cu(II) a Cu(I), siendo ésta la forma del ion que es interiorizada a la célula. Sin embargo, en condiciones de alta concentración de cobre, la célula debe activar los mecanismos para impedir la entrada de más cobre y para detoxificar el exceso del metal que ya ha entrado al citoplasma antes de que genere daños irreversibles. En primer lugar, se desactiva el factor de transcripción ScMac1p. Esto ocurre cuando los iones de cobre se unen a los agregados de cisteínas del C-terminal de la proteína, lo que causa un cambio conformacional del factor de transcripción (Nevitt *et al.*, 2012). Esto conlleva la represión de la expresión de nuevas proteínas importadoras ScCtr1p y ScCtr3p. Además, los transportadores

ya sintetizados que se hallan en la membrana son degradados (Nevitt *et al.*, 2012;Peña *et al.*, 1998). Al contrario que en ScMac1p, el cambio de conformación debido a la unión del cobre al N-terminal, resulta en la activación de ScAce1p. Esto promueve la unión del factor de transcripción al promotor de los genes *ScCUP1*, *ScCRS5* y *ScSOD1* (Peña *et al.*, 1998). ScCup1p y ScCrS5p son dos metalotioneinas cuya función es secuestrar el Cu(I) libre del citoplasma y neutralizarlo, disminuyendo así su toxicidad (Culotta *et al.*, 1997;Dancis *et al.*, 1994). Mientras que la proteína ScSod1p es una Cu/Zn superóxido dismutasa, que se encarga de neutralizar los radicales libres altamente reactivos generados en las reacciones Fenton (Gralla *et al.*, 1991).

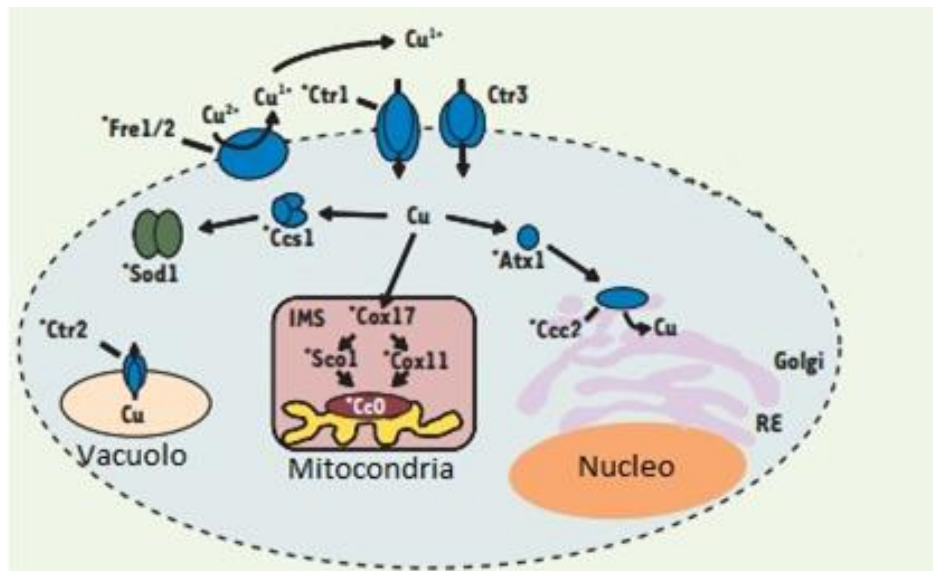


Figura 2. Homeostasis del cobre en el organismo modelo *S. cerevisiae* Laliberte (2008). En esta imagen se describen las proteínas encargadas tanto de la importación como de la detoxificación del cobre.

La homeostasis de cobre ha sido estudiada en diferentes organismos. Estos trabajos han demostrado que los mecanismos en diferentes organismos pueden ser algo distintos (Balamurugan and Schaffner, 2006;Nevitt *et al.*, 2012). *Candida Albicans* es un hongo dimórfico que se sitúa en el tracto gastrointestinal, en los genitales o la piel que puede causar enfermedades en individuos con inmunodeficiencia (Weissman *et al.*, 2000). *C. albicans* es muy resistente al cobre. Esto se debe al mecanismo de detoxificación desarrollado. A diferencia de *S. cerevisiae*, *C. albicans* no detoxifica el cobre principalmente a través de metalotioneinas, sino de una P_i -ATPasa de membrana denominada CaCrp1 (Riggle and Kumamoto, 2000;Weissman *et al.*, 2000). Esta proteína expulsa catalíticamente los iones de cobre fuera de la célula. En este organismo también existe una metalotioneina, CaCup1, pero su papel en la detoxificación es secundario (Weissman *et al.*, 2000). Ambas proteínas están reguladas por el factor de transcripción CaCup2. El proceso de importación de cobre en *C. albicans* es similar al descrito en *S. cerevisiae* (Marvin *et al.*, 2003;Wiemann *et al.*, 2017;Woodacre *et al.*, 2008) .

Cryptococcus neoformans es otro hongo patógeno causante de enfermedades como criptococosis pulmonar, neumonía aguda atípica o meningoencefalitis (Jiang *et al.*, 2011). A diferencia de *S. cerevisiae*, *C. neoformans* cuenta con un sólo factor de transcripción, CnCuf1, para la regulación tanto de la importación como la detoxificación de cobre. En condiciones de ausencia de cobre, CnCuf1 se encuentra dentro del núcleo donde activa la expresión de los

genes codificantes de las proteínas importadoras de alta afinidad (CnCtr1 y CnCtr4) (Beaudoin and Labbe, 2007; Wiemann *et al.*, 2017). En cambio, en condiciones de exceso de cobre, CnCuf1 se transloca al citoplasma, por lo que no se da la expresión de los importadores. A su vez, este cambio de localización causa la activación de la expresión de dos metalotioneínas (CnCmt1 y CnCmt2) encargados de la detoxificación del metal (Wiemann *et al.*, 2017). Se ha descrito que en el hongo levaduriforme *Schizosaccharomyces pombe* el mecanismo es similar (Beaudoin *et al.*, 2013; Beaudoin *et al.*, 2003).

En los últimos tres meses se han publicado tres artículos sobre el mecanismo de homeostasis en *Aspergillus fumigatus*, un hongo filamentoso patógeno causante de la aspergilosis, una enfermedad pulmonar con alta tasa de mortalidad (Kusuya *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2014). En los trabajos realizados se describe principalmente el mecanismo de importación. *A. fumigatus* contiene cuatro proteínas importadoras de alta afinidad AfCtrA1, AfCtrA2, AfCtrB y AfCtrC (Park *et al.*, 2014). Dos de ellos, AfCtrA2 y AfCtrC, son expresados y localizados en la membrana plasmática en condiciones de ausencia de cobre, por lo que se consideran las principales proteínas encargadas de su internalización (Park *et al.*, 2014). La expresión de estas proteínas, junto con la de dos metaloreductasas son controladas por el factor de transcripción AfMacA (Kusuya *et al.*, 2017). En cuanto al mecanismo de detoxificación se refiere, no había sido descrito hasta el 4 de mayo de 2017. En este trabajo se describe un segundo factor de transcripción AfAceA, similar al descrito para *S. cerevisiae* y *C. albicans*, que regula la expresión de una P_i-ATPasa de membrana y una metalotioneína, AfCrpA y AfCmtA respectivamente (Wiemann *et al.*, 2017).

Los trabajos realizados en estos organismos patógenos han puesto de manifiesto que la virulencia de los microorganismos está directamente relacionada con la homeostasis del cobre, principalmente por dos motivos: en primer lugar, la necesidad del cobre como cofactor en proteínas relacionadas con la virulencia, como es, por ejemplo, la lacasa que produce la melanina (pigmentación). En segundo lugar, por su capacidad de resistir a las altas concentraciones de cobre. Diversas estrategias utilizan el cobre como agente biocida, como por ejemplo, los fagosomas del sistema inmunitario del huésped infectado (Jiang *et al.*, 2011) (Ding *et al.*, 2011; Kusuya *et al.*, 2017) o como fungicida en agricultura y medicina. Por todo esto, el conocimiento del mecanismo de homeostasis de cobre supone una línea de trabajo muy estudiada en la actualidad.

Aspergillus nidulans, al igual que *A. fumigatus*, es un hongo del género *Aspergillus*. *A. nidulans* es uno de los organismos mejor caracterizados de este grupo y es el organismo modelo de referencia para el estudio de mecanismos de respuesta a estrés en hongos filamentoso. Los hongos filamentosos son un grupo de microorganismo que engloba tanto especies patógenas (plantas y humanos) como especies de interés industrial.

El trabajo realizado por el miembro del grupo Martzel Antsoetegi, ha demostrado que *A. nidulans* posee un factor de transcripción que participa en la regulación de la detoxificación de cobre (Antsoetegi-Uskola *et al.*, 2017). Este factor de transcripción, codificado por el gen *aceA*, induce la expresión de una proteína P_i-ATPase de membrana (CrpA) y un elemento adicional aun no identificado. No obstante, se ha demostrado que el principal efector de la resistencia al cobre es el exportador CrpA, similar a *Candida albicans*. En cuanto al proceso de importación se refiere, los resultados indican la existencia de dos transportadores de cobre de alta afinidad, CtrA y CtrB. Pero, hasta el momento, no se ha identificado el factor de transcripción involucrado en la regulación de estos elementos.

El objetivo de éste trabajo es identificar y caracterizar el factor de transcripción que regula el proceso de importación del cobre en *A. nidulans*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos utilizados para realizar este trabajo se describen a continuación.

Tabla 1. Cepas utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
MAD1427	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB^{Af}; veA1, riboB2</i>	Oakley B. TNO2A25
Δ<i>macA</i>	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB^{Af}; ΔAN0658::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Este trabajo BD1077
Δ<i>macA</i>	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB^{Af}; ΔAN0658::riboB^{Af}; veA1, riboB2</i>	Este trabajo BD1075
CtrB::GFP	<i>pyrG89, pabaA1; AN3813::GFP::riboB^{Af}; argB2; ΔnkuA::argB^{Af}; veA1, riboB2</i>	Antsotegi-Uskola M. BD878
Δ<i>ctrA</i>Δ<i>ctrB</i>	<i>pyrG89, pabaA1; ΔAN3813::riboB^{Af}; argB2; ΔnkuA::argB^{Af}; ΔAN3209::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Antsotegi-Uskola M. BD1064
CtrB::GFPΔ<i>macA</i>	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; nkuA::argB^{Af}; veA1; riboB2 AN3813:riboB:GFP ΔAN0658::pyrG^{Af}</i>	Este trabajo BD1111
Δ<i>aceA</i>	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔAN1924::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Antsotegi-Uskola <i>et al.</i> , 2017 BD965

Se utilizaron como molde para la obtención de los fragmento del marcador de selección *pyrG^{Af}* y *riboB^{Af}* los plásmidos p1439 y p1831, respectivamente.

3.1.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en la realización de PCR se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la realización de este trabajo








NOMBRE	Nº PARES DE BASES (pb)	TEMPERATURA DE FUSIÓN (°C)	SECUENCIA (5' → 3')	ESTRUCTURA SECUNDARIA
AN0658-gsp1	26	66.5	GGAGCTGAGAAAGTAAGGGAGAGAAG	NULA
AN0658-gsp2	25	69.8	GGCGAGTATACAGATTGGCGAAATG	NULA
AN0658-gsp2*	49	88.1	CATTTCCCAATCTGTATACTCGCCACCGGTCGCCTCAAACAATGCTCT	DEBIL
AN0658-gsp3	27	68.2	ATTTTATCCATTTGAGTGGATCAAGCC	MODERADO
AN0658-gsp3*	49	84.9	GGCTTGATCCACTCAAATGGATAAAAATGTCTGAGAGGAGGCACTGATGC	MODERADO
AN0658-gsp4	26	67.2	GCCTTGAGCTTCTTTAATAACCATCG	NULA
AN0658-gsp5	26	69.5	CGGCCGGTCTATAAGATGATACTTGG	MUY DEBIL
AN0658-gsp6	27	67.7	AGTAAACCAGCAACCAGAAACACGTAG	NULA
AN0658-gsp6*	51	90.6	CTACGTGTTTCTGGTTGCTGGTTTACTGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	MODERADO




(1) En cursiva se muestran los nucleótidos correspondientes a la secuencia del plásmido

3.1.2 Medios de cultivo y características

Las cepas de *A. nidulans* fueron cultivadas siguiendo los protocolos estandarizados para el crecimiento de este tipo de hongo (PONTECORVO *et al.*, 1953). Los medios se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. *Medios de cultivo utilizados durante la realización de este trabajo.*

MEDIOS DE CRECIMIENTO Y SOLUCIONES	COMPONENTES Y CANTIDADES (1 L solución)
Elementos traza Kaeffer 1000x 	22 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O 11 g H ₃ BO ₃ 5 g MnCl ₂ ·7H ₂ O 5 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 1.6 g CoCl ₂ ·6H ₂ O 1.6 g CuSO ₄ ·5H ₂ O 1.1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O 50 g Na ₂ EDTA Hasta 1 L H ₂ O
Soluciones de sales y Elementos Traza Kaeffer 20x	26 g KCl 26 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 76 g KH ₂ PO ₄ 50 mL Elementos Traza Kaeffer 1000x Hasta 1 L H ₂ O
MMA-M (Medio Mínimo de Aspergillus) 	20 mL de Solución de sales y Elementos traza Kaeffer 20x 15 g Agar (sólo en medios sólidos) Hasta 1 L H ₂ O
MCA-M (Medio Completo de Aspergillus) 	MMA-M 5 g extracto de levadura
MMR (Medio Mínimo de regeneración) 	20 mL Solución de sales y Elementos traza Kaeffer 20x 342 g sacarosa 15 g Agar (sólo en medios sólidos) Hasta 1 L H ₂ O
MMR-Top 	20 mL Solución de sales y Elementos traza Kaeffer 20x 342 g sacarosa 6 g Agar (sólo en medios sólidos) Hasta 1 L H ₂ O
Glucosa (20% p/v) 	200 g Glucosa Hasta 1 L H ₂ O
Nitrato de sodio 100x 	603.45 g NaNO ₂ Hasta 1 L H ₂ O

: Almacenado a 4°C, : Ajustado pH=6.8, : Esterilizado mediante autoclave

Los suplementos o **auxotrofías** requeridas por las cepas se representan en la Tabla 4.

Tabla 4. Auxotrofías utilizadas para el crecimiento de las cepas

AUXOTROFIAS	CANTIDAD (100 mL)
Uracilo	56 mg
Uridina	112.2 mg
Biotina	1 mg
Ácido para-aminobenzoico (Paba)	10 mg
Riboflavina (Ribo)	10 mg

Durante la realización del estudio de funcionalidad se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de CuSO_4 y del quelante de cobre BCS (Batocuproín sulfonato sódico) partiendo de la solución stock descrita en la Tabla 5.

Tabla 5. Soluciones utilizadas durante el estudio de funcionalidad

SOLUCIONES FENOTIPO	CANTIDAD (100 mL)
CuSO_4 Stock (100 mM)	2.497 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
BCS Stock (50 mM)	2.823 g BCS

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Construcción de cepas

La cepa mutante $\Delta macA$ se obtuvo mediante reemplazamiento génico, usando construcciones lineares de ADN que se generaron por amplificación mediante técnicas de PCR (Yang et al., 2004). El esquema del proceso se describe en la Figura 3.

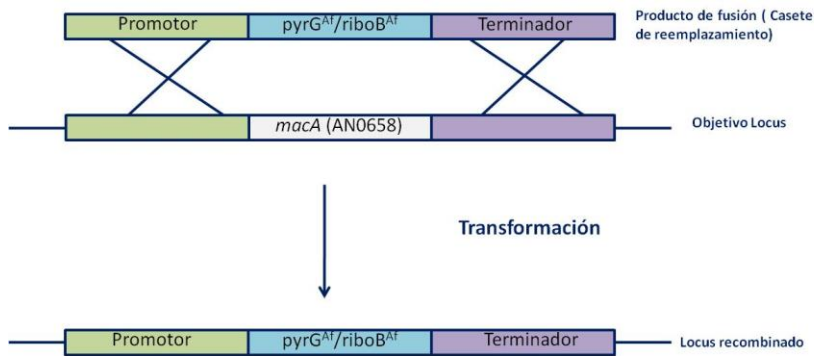


Figura 3. Generación del mutante nulo tras un doble suceso de recombinación homóloga entre el locus diana *macA* y el producto de la PCR de fusión durante el proceso de transformación de *A. nidulans*.

Generación de la construcción para la obtención del mutante

La enzima utilizada en el proceso fue la enzima PrimeStar[®] HS DNA polimerasa (Takara). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las que se indican en el protocolo de Takara, con pequeñas variaciones dependiendo de los oligonucleótidos utilizados o el tamaño del fragmento amplificado. Las condiciones se describen en la Tabla 6 y Tabla 7.

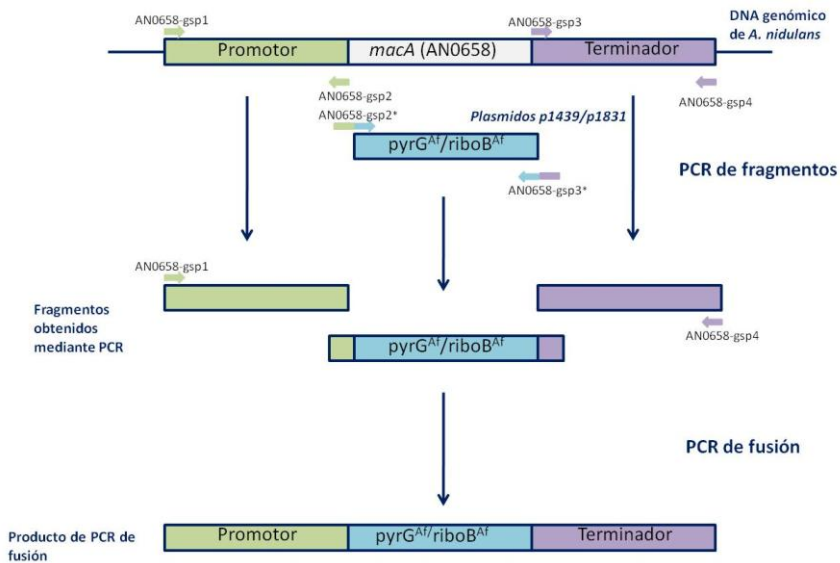


Figura 4. Estrategia para la amplificación de fragmentos y generación del casete de reemplazamiento mediante PCR de fusión.

- PCR de fragmentos

En primer lugar, mediante la técnica PCR, se amplificaron los fragmentos. Los fragmentos del promotor y terminador se amplificaron usando el ADN genómico de *A. nidulans* como molde, mientras que los genes *pyrG^{Af}* y *riboB^{Af}* se amplificaron usando los plásmidos p1438 y p1831, respectivamente. El fragmento del promotor, que corresponde a 1963 pb corriente arriba desde el codón de inicio del gen *AN0658* se amplificó usando los oligonucleótidos AN0658-gsp1 y AN0658-gsp2. Por otra parte, el fragmento del terminador, que corresponde a los 1541 pb corriente abajo desde el codón STOP del gen *AN0658*, se amplificó usando los oligonucleótidos AN0658-gsp3 y AN0658-gsp4. Los genes *pyrG^{Af}* y *riboB^{Af}* se amplificaron usando los oligonucleótidos AN0658-gsp2* y AN0658-gsp3*. Estos oligonucleótidos se diseñaron con el objetivo que tuvieran una secuencia complementaria al ADN plasmídico y una secuencia extra complementaria al ADN del promotor y terminador. De esta forma el fragmento obtenido tendrá colas solapantes que favorecen la posterior fusión. Los productos y cantidades cargadas en las reacciones de PCR y las condiciones utilizadas en el termociclador se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Productos y programa utilizado para la realización de la PCR de fragmentos.

PRODUCTOS Y CANTIDADES	PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR
-32 µL H ₂ O	- 98 c.....2 min (desnaturalización inicial)
-10 µL Tampón (5x5 p)	98 c10 s (desnaturalización)
-4 µL NTP mezcla	- X 10 59c15 s (anillamiento)
-1 µL molde <small>ADN/plasmido</small>	72c.....2 min/kb (elongación)
-1.5 µL+1.5 µL sol. diluida oligos (10x de Stock 100 µM)	98 c10 s (desnaturalización)
-0.3 µL enzima	- X 15 61c15 s (anillamiento)
_____	72c..... 2 min/kb (*20) (elongación)
50 µL en total	68c.....7 min (elongación final)

- PCR de fusión

Tras haber obtenido los fragmentos se prosiguió con su fusión mediante la PCR de fusión. Como se ha descrito en el apartado anterior, debido a que los fragmentos de los marcadores de selección tienen secuencias solapantes con los fragmentos del promotor y terminador, lo que favorece la fusión de los tres fragmentos. La fusión se realizó mediante la técnica PCR utilizando los oligonucleótidos de los extremos, AN0658-gsp1 y AN0658-gsp4.

Los productos, cantidades y las condiciones utilizadas en las PCRs de fusión se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Productos y programa utilizados durante la realización de la PCR de fusión

PRODUCTOS Y CANTIDADES	PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR
-32 µL H ₂ O	- 98 c.....2 min (desnaturalización inicial)
-10 µL Buffer (5x5 p)	98 c10 s (desnaturalización)
-4 µL NTP mezcla	- X 10 59c15 s (anillamiento)
-1 µL molde _{ADN/plasmido}	72c.....7 min/kb (elongación)
-1.5 µL+1.5 µL sol. diluida oligos (10x de Stock 100 µM)	98 c10 s (desnaturalización)
-0.3 µL enzima	- X 15 61c15 s (anillamiento)
_____	72c..... 7 min/kb (*20) (elongación)
50 µL en total	68c.....7 min (elongación final)

Tanto los fragmentos como los productos de fusión obtenidos se purificaron por columna (Macherey-nagel).

Transformación

La **transformación** se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Antsoetegi-Uskola *et al.*, 2017). En primer lugar, se inocularon $2.5 \cdot 10^6$ conidiosporas/mL en 150mL de MCA-líquido, junto a las fuentes de carbono (glucosa), nitrógeno (tartrato de amonio) y las auxotrofias (Uridina, uracilo, ribo y paba) requeridas por la cepa MAD1427. Se incubó el inóculo durante 14 horas a 30°C en agitación (150 rpm). Se filtró el cultivo utilizando miracloth. Se resuspendió 1.25 g de micelio en 16mL de solución 1 (1.1 M KCl, 0.017 mM ácido cítrico, pH=5.5), a la cual se le había añadido previamente 2.048 g de Vinotaste y 16 mL de MCA líquido debidamente suplementados. Se incubó la suspensión durante 2 h, a 30°C y a 100 rpm. Se comprobó la formación de **protoplastos** mediante la observación de la muestra en el microscopio óptico.

Una vez obtenidos los protoplastos fueron lavados y concentrados. Para ello, se dividió la suspensión de protoplastos en dos falcon de 50mL (16mL de solución por tubo). Se añadió el mismo volumen de solución 2 (1.2M sacarosa) a cada tubo muy lentamente con el objetivo de generar dos fases de distinta densidad. Se centrifugó la mezcla a 1800 g durante 10 minutos a 4°C. Se recogieron con una pipeta Pasteur los protoplastos localizados en la interfase y se diluyeron con el mismo volumen de solución 3 (0.6 M KCl). Se centrifugó la mezcla a 1800 g, durante 10 minutos a 4°C. Se lavaron los protoplastos tres veces más con la solución 3 y dos veces con la solución 4 (0.6 M KCl, 50 mM CaCl₂) mediante centrifugación a 2400 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron los protoplastos en 1 mL de solución 4.

Tras haber obtenido los protoplastos, se prosiguió con su transformación. Este proceso comenzó al mezclar la solución de protoplastos con 10 μ M del **casete génico** obtenido en la PCR de fusión. La suspensión se mezcló vigorosamente, utilizando el vortex, 8 veces durante 1 segundo a máxima velocidad con el objetivo de facilitar la entrada de ADN dentro del protoplasto. Se añadieron 50 μ L de solución 8 (PEG6000 60% p/v, 10 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM CaCl_2) y la suspensión se mezcló nuevamente, 5 veces durante 1 segundo a máxima velocidad. Se incubó la suspensión en hielo durante 20 minutos, se le añadió 1 mL de solución 8 y se incubó durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Para finalizar, se añadió solución 7 (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM CaCl_2) hasta 5 mL y se completó, hasta 20 mL, con MMR-Top. Se repartió el producto en placas Petri con medio mínimo de regeneración (MMR) debidamente suplementado. Se observaron las colonias tras 4 días de incubación a 37°C.

Los transformantes obtenidos fueron "purificados" mediante la siembra de conidiosporas en medio mínimo (MMA) selectivo. Mediante este proceso se seleccionaron las conidiosporas que portaban un núcleo recombinante portador del gen de selección de *A. fumigatus* el cual confiere la capacidad de germinar en medio selectivo. Los transformantes portadores del gen *pyrG^{Af}* crecieron en MMA sin uracilo ni uridina. Sin embargo, los transformantes portadores del gen *riboB^{Af}* crecieron en MMA carente de riboflavina.

El proceso se repitió a los 2 días.

3.2.2 Análisis de sensibilidad de la cepa $\Delta macA$ al BCS y al cobre

Con el objetivo de establecer la función del producto del gen *macA* diferentes cepas fueron sometidas a un análisis de sensibilidad. Las cepas estudiadas fueron la cepa MAD1427, la cepa $\Delta macA$ (BD1077), la cepa $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064) y la cepa $\Delta aceA$ (BD965).

Estas cepas se inocularon en medio mínimo sólido con diferentes concentraciones de cobre: MMA + 100 μ M de BCS ($\sim 0 \mu$ M Cu), MMA ($\sim 1.6 \mu$ M Cu), MMA + 10 μ M de CuSO_4 , MMA + 200 μ M de CuSO_4 . Estas placas se cultivaron a 37 °C durante 48 h. El experimento fue realizado por triplicado

3.2.3 Extracción de ADN

Se recogieron esporas de cada transformante y se inocularon en 2 mL de Tween 10^{-4} M. La suspensión obtenida se cultivo en 30 mL de MMA líquido suplementado a 30°C durante toda la noche. Se filtró el micelio y se liofilizó durante 10 horas. Se trituró el micelio liofilizado en una Minibeater y se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis (Tris 25 mM pH=8, 0.25 M Sacarosa y 20 mM EDTA pH=8). Tras añadir 200 μ L de SDS 10% la suspensión se incubó durante 15 minutos a 65°C en un Termoblock.

Se añadió 1 mL de fenol seavage (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (49:48:2)) a cada suspensión y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Se centrifugó la suspensión a 14000 rpm durante 5 minutos y se repitió el mismo proceso con la fase acuosa obtenida.

Se precipitó el ADN genómico de la fase acuosa añadiendo una décima parte del volumen de 3 M NaAc (pH=6) y 0.6 partes del volumen de isopropanol. Se incubó el producto durante 15 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se lavó el pellet con 1 mL de EtOH 80%. Tras una segunda centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300-500 mL de Agua MiliQ dependiendo del tamaño de éste. Se trataron las muestras con RNAsa-A (Roche) a 37°C durante 1 hora, para prevenir posibles contaminaciones de RNA. Se precipitó el ADN genómico con la misma solución de NaAc e isopropanol utilizado anteriormente. Se lavo de nuevo el pellet con 0.5 mL de EtOH 80%. Se secó bien el pellet. Finalmente, se resuspendió el pellet en 100-200 µL de Agua MiliQ y se guardaron las muestras a -20°C.

3.2.4 Extracción de proteína

El proceso de extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Hervás-Aguilar and Penalva, 2010). Se recogieron las esporas de cada cepa en 2 mL de Tween 10⁻⁴ M. La suspensión obtenida se inoculó en 30 mL de MMA líquido suplementado durante 16 horas a 30°C.

Se filtró el micelio, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 10 horas. Una vez liofilizado, el micelio fue machacado en un Minibeater. Se resuspendió 6-7 mg de micelio en 1 mL de tampón de lisis (0.2 M NaOH, 0.2% β-mercaptoetanol). Se precipitaron las proteínas añadiendo 75 µL de TCA 7.5% y se incubó la solución en hielo durante 10 minutos. Para eliminar el TCA la muestra fue centrifugada dos veces a 4°C y 14000 rpm durante 5 minutos.

Se añadió 100 µL de Tris Base y 200 µL de tampón de ruptura al pellet para resuspenderlo. Para finalizar, se mezcló vigorosamente la muestra durante 30 segundos, se centrifugó durante 1 minuto y se guardó a -20°C.

3.2.5 Southern-Blot

La técnica de **Southern-Blot** (Sambrook *et al.*, 2017) se utilizó para establecer un patrón de bandas que permite distinguir los transformantes que portan la alteración (inserción del gen *pyrG^{Af}* o *riboB^{Af}*) en el locus de interés, *macA* (AN0658).

Las muestras del ADN genómico extraídos se digirieron con la **enzima endonucleasa** Sall (Takara) y se corrieron en un gel de agarosa 0.8% durante dos horas. Se expuso el gel a 10 minutos a luz UV (260nm) y se incubó en una solución desnaturizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) durante 45 minutos y dos veces durante 30 minutos en una solución neutralizante (0.5 M Tris-HCl pH=7.5, 3 M NaCl). Posteriormente, se homogeneizó el gel con la solución 2xSSC (dilución de 20xSSC (3M NaCl, 0.35M sodio citrato, pH=7)) durante 10 minutos. El sistema de transferencia utilizado para la transferencia del ADN del gel a la membrana de nylon se muestra en la Figura 5.

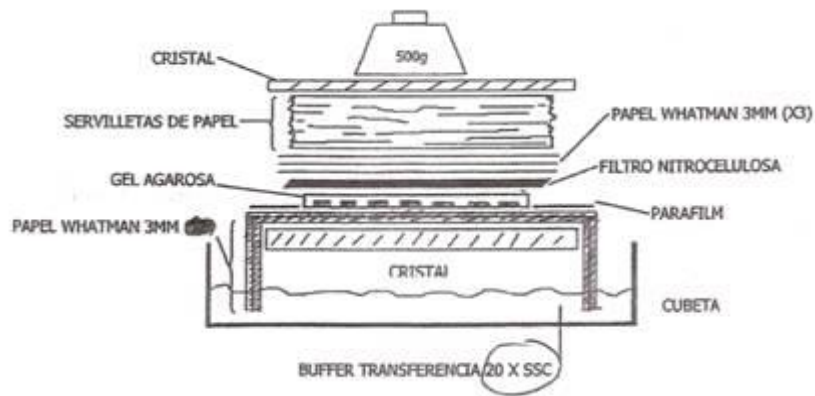


Figura 5. Esquema del sistema de transferencia capilar de ADN genómico desde el gel a la membrana.

El ADN transferido a la membrana de nylon se fijó mediante su exposición a dos pulsos de luz UV (120 mJ) en el stratalinker. La membrana se prehibridó mediante su incubación en solución de carga (1% BSA, 0.5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, 7% SDS) durante dos horas antes de ser hibridada. Para ello, se utilizó el fragmento del terminador como la sonda específica. La sonda fue marcada con digoxigenina siguiendo el protocolo marcado por el kit DIG High Prime DNA labelling and detection starter kit II (Roche).

Se incubó la membrana a 42°C durante 16 horas. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con 2xSSC-N/0.1%SDS y otros dos de 15 minutos a 65°C con 0.5xSSC-N/0.1%SDS para eliminar el DIG sobrante. Se lavó la membrana con la solución de limpieza (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20, pH=7.5) durante 5 minutos. Se incubó la membrana durante 30 minutos con la solución de bloqueo del kit. Se añadieron 2µL de Anti-Dioxigenin-AP 1:10000 a 20 mL de solución de bloqueo y se incubó la solución con la membrana durante 30 minutos. Se lavó la membrana y fue neutralizada con la solución de detección, tras lo que fue colocada en una superficie de plástico. Posteriormente, el agente cromogénico CSPD ready-to-use (Roche) se añadió a la cara de la membrana contenedora de ADN y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos más a 37°C para mejorar la reacción luminiscente. Para terminar, se tomaron las imágenes de la detección con XR GelDoc chemiluminescence Analyzer y se procesaron con el programa ImageLab.

3.2.6 Western-Blot

En primer lugar, se realizó la mezcla 10% SDS-PAGE (acrilamida, 0.375 M Tris-HCl, 0.1% SDS, PSA y TEMED) necesaria para hacer el gel y, luego, se dejó polimerizar en la cubeta. A continuación, se añadió la solución de apilamiento (acrilamida, 0.375 M Tris-HCl, 0.1% SDS, PSA, TEMED) y se dejó polimerizar.

Las muestras, conservadas a -20°C, se mezclaron vigorosamente durante 30 segundos, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos en el termoblock y se centrifugaron durante 1 minuto a 14000 rpm. Se cargaron 10 µL de las muestras en el gel y se dejó correr. Primero, a 15 mA/gel hasta que las muestras pasaron la solución de apilamiento y luego a 30 mA/gel. Se guardó el gel en agua mientras se preparó la transferencia. Se colocó la membrana (Transblot Transfer Pack) encima de gel y se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana en el sistema de transferencia TransBlot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad).

Una vez realizada la transferencia, la membrana fue lavada durante 10 minutos en PBS 1x (dilución de PBS 10x (80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14.4 g/L Na₂HPO₄, 2.4 g/L KH₂PO₄, pH=7.4)) y se incubó en solución de bloqueo (15 mL de PBS 1x, 5% leche en polvo) durante una hora y 40 minutos. Se realizó un lavado de 10 minutos con PBS-T (PBS 20%, Tween 20 0.02%) y tres lavados más de 5 minutos con la misma solución. Posteriormente, la membrana fue incubada en PBS-T con el primer anticuerpo (anti-GFP de ratón, dilución 1:3000) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron cuatro lavados con PBS-T, 3 lavados de 10 minutos y uno más de 5 minutos, con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo. La membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente en PBS-T con el segundo anticuerpo (α -ratón de IgG de cabra, dilución de 1:4000). Nuevamente se realizaron cuatro lavados con PBS-T, 3 lavados de 10 minutos y uno más de 5 minutos, y un lavado con PBS 1x de 10 minutos.

Para finalizar se llevó a cabo el revelado. Para ello, se añadió a la membrana 1 mL de mezcla de revelado (clarity ECL Enhanced Chemiluminescent) y se incubó durante 1 minuto. La detección de las proteínas se realizó en el analizado de imágenes Chemdoc tras 6 minutos de exposición.

Posteriormente, como control de carga, se realizó la detección de la actina. Para ello, en primer lugar, se realizaron varios lavados para eliminar los anticuerpos anteriores. Se lavó la membrana dos veces durante 10 minutos con glicina ácida (0.1 M glicina, 20 mM acetato de magnesio, 50 mM KCl, pH=2.2) y tres veces durante 5 minutos con TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH=7.5). Se volvió a incubar la membrana durante una hora y 40 minutos en la solución de bloqueo. A partir de este paso se volvieron a repetir los mismos pasos realizados anteriormente con la detección de GFP. Para este segundo caso se utilizó el primer anticuerpo α -actina de ratón con una dilución de 1:20000. El segundo anticuerpo, para los dos casos, fue el mismo.

Como control de carga adicional se realizó otro gel idéntico al anterior y se le aplicó la tinción de Coomassie. Una vez terminado el proceso de separación de proteínas, el gel fue lavado tres veces durante 5 minutos con agua y posteriormente incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de Coomassie. La fotografía del gel fue tomado con una cámara digital Nikon.

3.3 KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- **PrimeStar® HS DNA polimerasa (Takara):** Enzima utilizada en las reacciones PCR
- Kit de purificación de ADN, ARN y proteínas **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** de la empresa Macherey-nagel: Tras la obtención tanto de los fragmentos como de la fusión, se purificaron los productos por columna siguiendo las instrucciones marcadas en el kit.
- **DIG High Prime DNA LABELING AND DETECTION STARTER KIT II (Roche):** Utilizado en el Southern-Blot.
- **ZETA-PROBE BLOTTING MEMBRANES (BIO-RAD):** Utilizado en el Southern-Blot.
- **TRANSBLOT TRANSFER PACK (BIO-RAD):** Utilizado en el Western-Blot.
- **Sal I (Takara):** Utilizado en la digestión del Southern-Blot.
- **RNAsa (Sigma)**
- **Marcador de peso electroforesis (Nippon Genetics)**
- **Precision plus protein dual color standars (BIO-RAD):** Marcador de peso utilizado en el Western-Blot
- **SDS_Page standar low range (BIO-RAD):** Marcador de peso utilizado en la prueba Comassie.
- **CSPD ready to use:** Utilizado en el proceso de revelado del Southern-Blot
- **Clarity western ECL substrate:** Utilizado en el proceso de revelado del Western-Blot.

4.RESULTADOS

Previamente, en el laboratorio de Bioquímica II, se identificó AceA como factor de transcripción activador de la expresión del gen *crpA*. Este gen codifica una P₁-ATPasa de membrana que exporta el cobre en condiciones de exceso de dosis, participando así en la detoxificación celular del ion.

Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar si en *Aspergillus nidulans*, existe un segundo factor de transcripción relacionado con la homeostasis del cobre, el cual participaría en la regulación de la adquisición del catión.

4.1 IDENTIFICACIÓN DE MacA

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de identificar factores de transcripción de organismos modelo que estuvieran implicados en la regulación de la importación del cobre. Estos resultados quedan resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los factores de transcripción identificados que participan en la homeostasis de cobre en diferentes especies organismos

ID	<i>A. nidulans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. neoformans</i>	Descripción
CBF89044.1	MacA	Mac1p	Mac1	MacA			Regulador de la importación de cobre
					Cuf1	Cuf1	FT de doble función
CBF85835.1	AceA	Ace1p	Cup2	AceA			Regulador de la detoxificación de cobre

A continuación, se realizó un análisis bioinformático con el objetivo de encontrar el posible homólogo de los factores reguladores de la importación en *A. nidulans*. Para ello se realizaron diferentes búsquedas y comparaciones [Blastp](#) con las secuencias de aminoácidos de dichos FT. El Blast (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta informática de alineamiento de secuencias, ya sea genómica (Blastn) o proteica (Blastp), en el que se compara una secuencia "problema" contra una y/o una gran cantidad de secuencias depositadas en una base de datos. Esta herramienta posibilita la identificación de candidatos basándose en la similitud de secuencias.

Primeramente, se realizó una búsqueda utilizando la secuencia de ScMac1p (AAT92953.1) como cebo. De esta manera, se identificaron dos posibles candidatos en *Aspergillus nidulans*; la proteína codificada por el gen AN0658 y la proteína codificada por el gen AN1924. Se identificó un tercer gen AN5716 cuyo producto no parece estar relacionado con la homeostasis del cobre. Asimismo, las búsquedas realizadas con CaMac1p de *C. albicans* (Q5AFK0), CnCuf1p (CNAG_07724) de *C. neoformans* y SpCuf1p (NP_592923) de *S. pombe* identificaron a AN0658

y AN1924 como posibles homólogos de *A. nidulans*. Como se observan en la Tabla 9 los resultados de la cobertura y el valor E obtenidos son bajos (cobertura máxima de 16% y $E > 7.10^{-17}$), lo que indica que la similitud entre las secuencias proteicas es baja. Sin embargo, en la búsqueda realizada utilizando la secuencia de AfMacAp (EAL90651.1) de *A. fumigatus* como cebo se obtuvo un único candidato, AN0658, con una cobertura de 75%, valor $E = 6 \cdot 10^{-23}$ e identidad=31%. Estos resultados indican que estas dos proteínas tienen una similitud de secuencia alta.

Posteriormente, se realizaron búsquedas en sentido inverso, es decir se buscaron los homólogos de *A. nidulans* en las especies citadas, indicados en las Tablas 10 y 11. Los análisis realizados utilizando como cebo las secuencias proteicas codificadas por AN0658 (CBF89044.1) y AN1924 (CBF85835.1) apuntaron, en ambos casos, a ScHaa1p, ScCup2p y ScMac1p de *S. cerevisiae*; CaCup2p y CaMac1p de *C. Albicans*; SpCuf1p de *S. pombe* y CnCuf1p en *C. neoformans* como posibles candidatos. Nuevamente, los resultados indican que la similitud entre las proteínas no es elevada, a excepción de AfMacA (cobertura de 44%, valor $E = 2 \cdot 10^{-14}$ e identidad=29%)

Tabla 9. Resumen de los Blast utilizando las secuencias de FT de cada especie como cebo para encontrar los candidatos en *A. nidulans*.

Secuencia Cebo	Candidatos Identificados	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
ScMac1p (AAT92953.1)	AN0658	8	$3 \cdot 10^{-6}$	54
	AN1924	9	$6 \cdot 10^{-7}$	45
	AN5716	18	1,1	29
CaMac1 (Q5AFK0)	AN0658	12	$2 \cdot 10^{-5}$	46
	AN1924	8	$2 \cdot 10^{-9}$	61
CnCuf1 (CNAG_07724)	AN0658	8	$1 \cdot 10^{-6}$	51
	AN1924	6	$1 \cdot 10^{-17}$	57
SpCuf1 (NP_592923)	AN0658	10	$2 \cdot 10^{-4}$	61
	AN1924	16	$7 \cdot 10^{-17}$	52
AfMacA (EAL90651)	AN0658	75	$6 \cdot 10^{-23}$	31

Tabla 10. Resultados de las búsquedas realizadas en sentido inverso utilizando la secuencia proteica del producto de AN0658 de *A. nidulans* como cebo.

Secuencia Cebo (<i>A. nidulans</i>)	Candidatos Identificados	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
AN0658 (CBF89044)	ScMac1p	7	1.10^{-6}	54
	ScAce1p	15	6.10^{-9}	37
	ScHaa1p	16	3.10^{-9}	35
	CaMac1	7	1.10^{-5}	46
	CaCup2	13	6.10^{-8}	34
	CnCuf1	8	3.10^{-7}	51
	SpCuf1	10	2.10^{-9}	42
	AfMacA	44	2.10^{-14}	29

Tabla 11. Resultados de las búsquedas realizadas en sentido inverso utilizando la secuencia proteica del producto de AN1924 de *A. nidulans* como cebo.

Secuencia Cebo (<i>A. nidulans</i>)	Candidatos Identificados	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
AN1924 (CBF85835)	ScMac1p	7	4.10^{-7}	45
	ScAce1p	19	2.10^{-15}	35
	ScHaa1p	21	5.10^{-18}	39
	CaMac1	7	6.10^{-9}	61
	CaCup2	19	2.10^{-23}	47
	CnCuf1	13	5.10^{-18}	50
	SpCuf1	12	4.10^{-17}	52
	SpCuf2	11	4.10^{-14}	42
AfAceA	99	0.0	64	

En conjunto los resultados de los alineamientos indican que la similitud de secuencias entre los diversos factores de transcripción no es elevada (analizando tanto la baja cobertura como el alto valor E), a excepción de *A. fumigatus*. Por esta razón, se prosiguió con la búsqueda del factor transcripcional regulador de la importación de cobre en *Aspergillus nidulans* mediante la identificación de dominios funcionales conservados característicos de estos reguladores (Beaudoin *et al.*, 2013; Jungmann *et al.*, 1993).

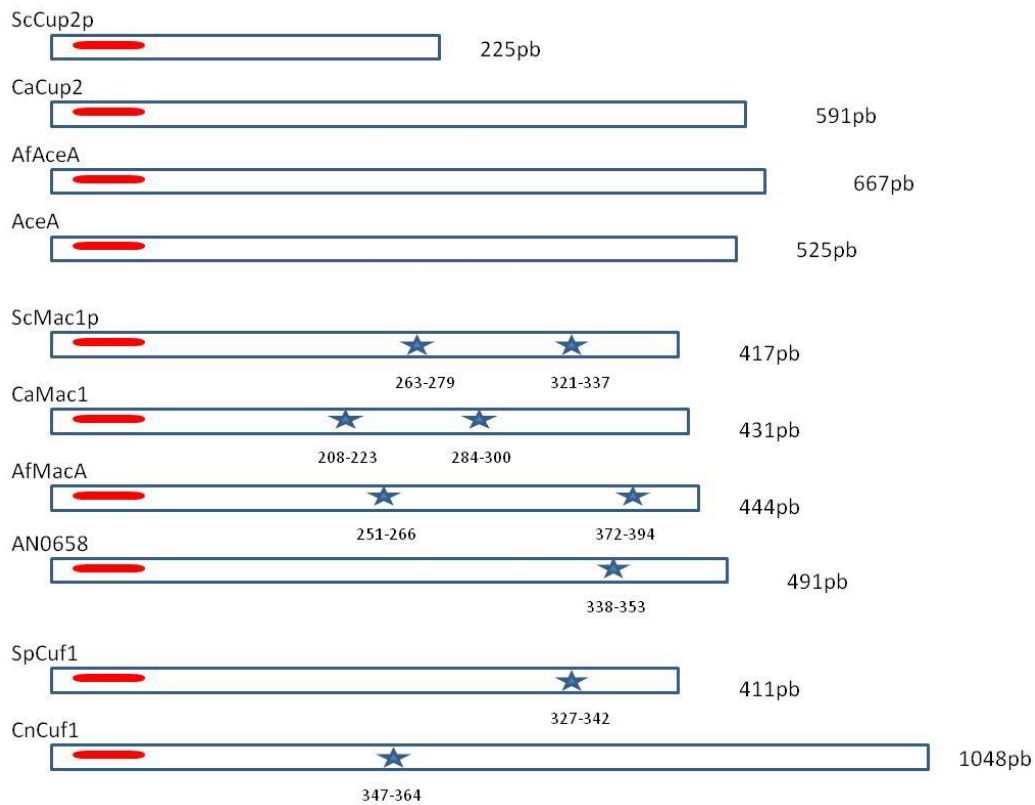


Figura 6. Alineamiento de factores de transcripción y localización de dominios conservados. La Raya roja representa el dominio N-terminal "DNA fist-binding domain" rico en cisteínas y las estrella los agregados de cisteínas en el C-terminal. Las proteínas alineadas corresponden a: AN0658 (CBF89044.1) y AceA (CBF85835.1) de *A. nidulans*, AfMacA (EAL90651.1) y AfAceA (XP_750669.1) de *A. fumigatus*, ScMac1p (AAT9253.1) y ScCup2p (YGL166W) de *S. cerevisiae*, CaMac1 (Q5AFK0) y CaCup2 (AOW26966.1) de *C. Albicans*, SpCuf1 (NP_592923.1) de *S. pombe* y CnCuf1 (CNAG_07724) de *C. neoformans*.

Como se puede observar en la Figura 6, todos los factores de transcripción relacionados con la homeostasis del cobre conservan en el extremo amino terminal una secuencia rica en cisteínas que se denomina "Fist DNA binding domain" necesario para la unión del factor al ADN. La similitud de secuencia de los 40 aminoácidos de este extremo amino es muy elevada, tal y como se observa en la Figura 7. Sin embargo, solo los factores relacionados con la importación contienen 1 o 2 agregados de cisteínas (C-X-C-X₄-C-X-C-X₂C-X₂-H) en el extremo carboxilo terminal (Figura 6, estrella azul).

```

ScCup2p      -MVGINGVKYACETCIRGHRAAQCTHTDGPLQMIRRKGRPS-
CaCup2       --MLIKGVKYACERCIRGHRVTTCTHSNEPLTMIKPKGRPV
AceA         --MLIDGEKWACEACVRGHRVSSCHHNRPLTHINKKGRPV
ScMac1p      -MIIFNGNKYACASCIRGHRSSCTCRHSHRMLIKVRTRGRPS-
CaMac1       -MILIDDIKYACMECVRGHRSSSCKHHERPLLQVRSKGRPG-
AN0658      MPFDENGVKWSCEPCIRGHRSSKCAHYDRLMVSVGKAGRP--
CnCuf1       -MVLINDKKFACEKCIKGHRVSACTHTDRPLFEVKKKGRPS-
SpCuf1       -MVVINNVKMACMKCIRGHRSSCTCKHNDRELFPIRPKGRPI-
              .  .. * : * * : : * * * : * * . : :   ***

```

Figura 7. Alineamiento de los 40 aminoácidos del N-terminal. Los asteriscos muestran una coincidencia exacta, el doble punto muestra la conservación de función del aminoácido y el punto simple muestra la conservación de la naturaleza del aminoácido.

Dado que de los dos posible candidatos, únicamente el producto de AN0658 contiene este dominio característico, determinamos que el posible factor de transcripción regulador de la importación del ion de cobre en *Aspergillus nidulans* esta codificado por AN0658. Por esta razón, el gen AN0658 fue designado *macA*, por lo que en los siguientes apartados se referirá a este gen como tal.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE MacA

Una vez identificado a MacA como el posible factor de transcripción que induce la expresión de las proteínas necesarias para la importación de cobre, se realizó un análisis para verificar su función. La función de una proteína es asumida cuando su ausencia causa que la función en la que participa se vea comprometida.

Para realizar este análisis funcional se generó una cepa mutante nula $\Delta macA$ (BD1077) y se comparó su crecimiento con una cepa silvestre (MAD1427) y una cepa mutante doble nula de los importadores de alta afinidad de cobre $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064), generada por Martzel Antsoategi, y que presenta un fenotipo característico en condiciones de escasez de cobre.

4.2.1 Generación de la cepa mutante $\Delta macA$ (BD1077)

En primer lugar, mediante el programa bioinformático VectorNTI versión 10.1.1 se diseñaron las construcciones de los casetes y los oligonucleótidos necesarios (Materiales y Métodos, Tabla 2) para su generación.

Posteriormente, se prosiguió con la amplificación de los fragmentos y su fusión. La Figura 8B corresponde con los fragmentos obtenidos mediante PCR: promotor (tamaño teórico de 1963 pares de bases (pb)), terminador (1538 pb), marcador de selección *pyrG* de *A. fumigatus* (1898 pb) y *riboB* de *A. fumigatus* (2201 pb). Como se observa en la Figura 8, los tamaños de los fragmentos coinciden con el tamaño teórico esperado.

Tras su purificación, los fragmentos fueron fusionados mediante PCR de fusión, obteniendo así los casetes génicos necesarios para la generación de mutantes nulos $\Delta macA$. Estos casetes coinciden con el tamaño teórico esperado (Figura 8C); 5399 pb en el caso de la construcción que contiene el gen *pyrG^{Af}* y 5702 pb en el caso de *riboB^{Af}*.

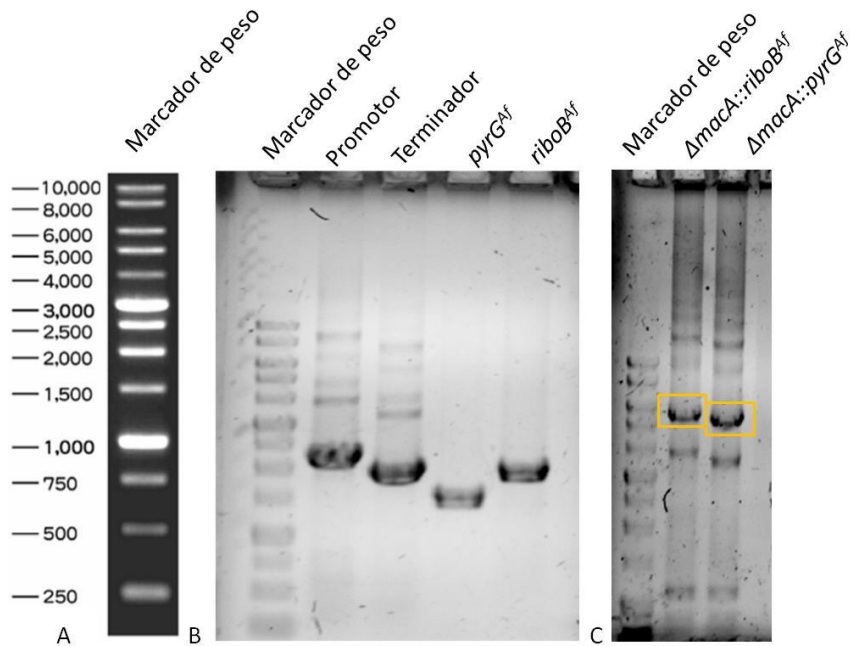


Figura 8. (A) marcador de peso molecular utilizado. (B) fragmentos de ADN obtenidos mediante la técnica de amplificación por PCR: promotor y terminador del gen *macA* y los genes *pyrG^{Af}* y *riboB^{Af}*. (C) Casetes génicos obtenidos mediante PCR de fusión: $\Delta macA::pyrG^{Af}$ y $\Delta macA::riboB^{Af}$.

Una vez obtenidos los casetes génicos, se prosiguió a transformar la cepa MAD1427. Se realizaron dos transformaciones de manera paralela, una con el casete $\Delta macA::pyrG^{Af}$ y otra con el casete $\Delta macA::riboB^{Af}$, aunque por concisión, en este trabajo sólo se presentaran los resultados obtenidos con el casete $\Delta macA::pyrG^{Af}$.

La Figura 9 corresponde con los resultados obtenidos en la transformación. Tal y como se puede observar (Figura 9C) se obtuvo un gran número de transformantes. Aunque se realizaron 4 placas para cada transformación en esta figura se muestra una única placa representativa de todas las demás. El crecimiento en césped de los protoplastos (control de regeneraciones celular, Figura 9A) y la ausencia total de crecimiento colonial en la placa de control de contaminación (Figura 9B) indican que el experimento se realizó correctamente.

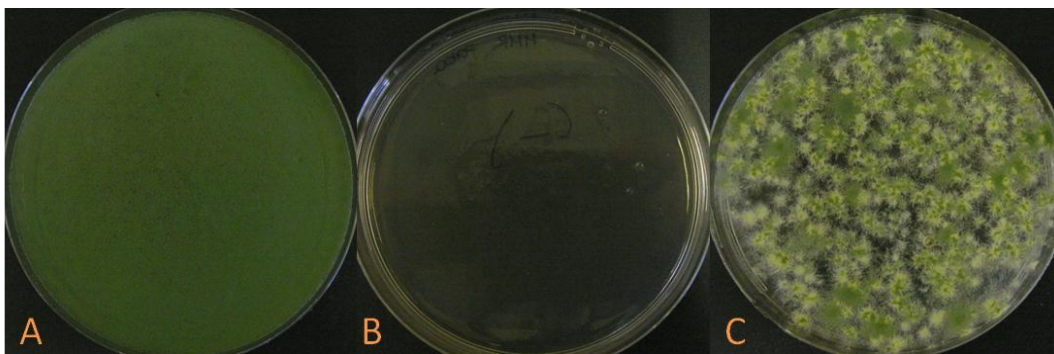


Figura 9. Resultado de la transformación. (A) Placa de control de regeneración MMR no-selectivo (uridina/uracilo) (B) Placa de control de contaminación. MMR selectivo (-uridina/uracilo). (C) Placa de transformantes. MMR selectivo + el casete $\Delta macA::pyrG^{Af}$.

A continuación, con el objetivo de purificar los transformantes, se inocularon 6 colonias en medio mínimo no selectivo (MMA +uracilo/uridina, Figura 10A) y medio selectivo (MMA-uracilo/uridina, Figura 10B). Las dos primeras cepas corresponden a la cepa parental MAD1427. Estas cepas fueron inoculadas como control de crecimiento. Dado que son auxótrofas para las pirimidinas (uracilo y uridina) sólo crecen en medio no-selectivo (+uracilo/uridina). El resto de colonias (nº 1-6) corresponden a los transformantes, seleccionados de manera aleatoria, de las cuatro placas de transformación. El crecimiento positivo de éstos indica que estos transformantes son protótrofos para las pirimidinas por lo que contienen el gen *pyrG^{Af}* del casete de recombinación.

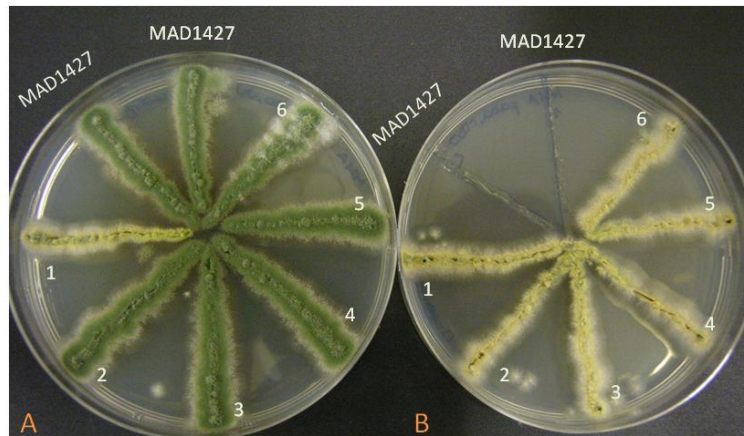


Figura 10. Placas de purificación. (A) Crecimiento en MMA no selectivo. (B) Crecimiento en MMA selectivo.

Posteriormente se procedió a verificar la correcta inserción de la construcción $\Delta macA::pyrG^{Af}$ en el genoma de *Aspergillus*. Para ello, se extrajo el ADN de 4 transformantes obtenidos con el casete que contiene el gen *pyrG^{Af}* y 4 generados con el gen *riboB^{Af}*, y se realizó un Southern-Blot (Figura 11).

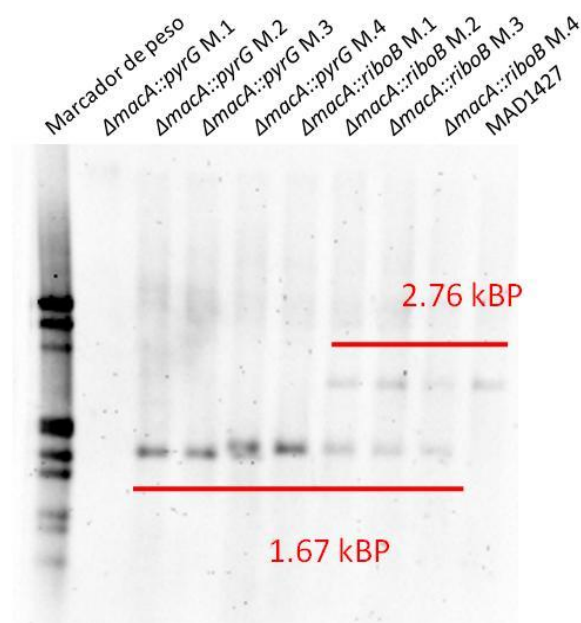


Figura 11. Resultado del Southern-Blot.

La digestión del ADN se realizó con la enzima Sall y se utilizó el terminador del gen *macA* como sonda. Mediante el programa informático Vector NTI se calcularon los tamaños teóricos de los fragmentos obtenidos durante la digestión. Para el caso de la cepa silvestre, el tamaño calculado para el fragmento fue de ~2.76kb. Mientras que para las cepas transformadas fue de ~1.78kb.

Los resultados indican (Figura 11) que en al menos los clones 2 y 3 de los mutantes nulos de $\Delta macA::pyrG^{Af}$ y en el clon 1 $\Delta macA::riboB^{Af}$ se ha dado una correcta **recombinación** de la construcción. A estas cepas mutantes se les asignó un número en la base de datos (ver Tabla 1 en Materiales y Métodos) y fueron guardadas en la colección de cepas del laboratorio.

4.2.2 Estudio de funcionalidad

Tras haber obtenido las cepas mutantes nulas $\Delta macA$ se realizó un estudio de funcionalidad con el objetivo de determinar si este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de los importadores de alta afinidad de cobre en *Aspergillus nidulans*. Este estudio se realizó tanto con la cepa $\Delta macA::pyrG^{Af}$ clon 2 denominada BD1077 y $\Delta macA::riboB^{Af}$ clon 1 denominada BD1075. Dado que los resultados fueron los mismos y por razones de concisión, en este estudio únicamente se enseñan los resultados obtenido con la cepa $\Delta macA::pyrG^{Af}$ (BD1077).

Para ello se inoculó la cepa mutante $\Delta macA$ (BD1077) en medios con diferentes concentraciones de $CuSO_4$ y BCS y se estudió el crecimiento de la colonia a las 48 horas. Los resultados de crecimiento y morfología colonial de la cepa mutante $\Delta macA$ fueron analizados comparando con la cepa silvestre MAD1427 y la cepa doble nula de los dos importadores de alta afinidad de cobre $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064).

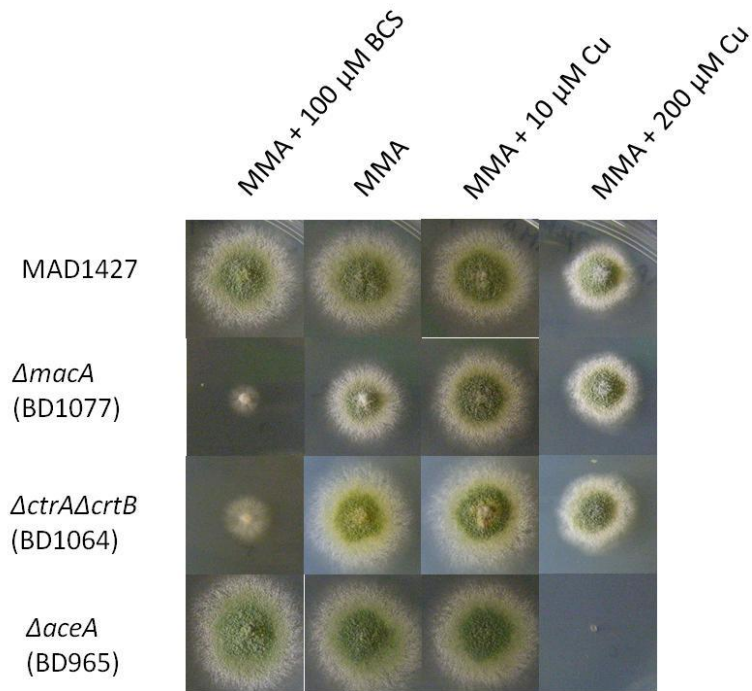


Figura 12. Resultados del estudio de funcionalidad. En él se muestran las cepas estudiadas (MAD1427, $\Delta macA$ (BD1077), $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064) y $\Delta aceA$ (BD965)) en MMA con diferentes adiciones de $CuSO_4$ y BCS.

Como se observa en la Figura 12 el crecimiento de la cepa silvestre fue similar en todas las condiciones probadas. En el caso de la cepa doble nula $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064) se observa una severa inhibición de crecimiento colonial en medio con BCS. El BCS (Batocuproín sulfonato sódico) es un quelante del cobre que impide la adquisición celular del catión. Esta situación se asemejaría a una condición de escasez de cobre en la que los importadores de alta afinidad de cobre están activos y su expresión es máxima. Como se puede observar la ausencia de ambos importadores afecta significativamente al crecimiento colonial cuando la cantidad de cobre en el ambiente es baja, es decir, el crecimiento disminuye un 50% con respecto al crecimiento normal de la cepa silvestre. El crecimiento de la cepa mutante mejora en medio mínimo (MMA) el cual contiene una concentración de cobre aproximada de $1.6 \mu M$. No obstante, el color de las esporas es más amarillento que la cepa silvestre, aunque la adición al medio de $10 \mu M$ de $CuSO_4$ recupera la pigmentación normal de las esporas.

La cepa nula $\Delta macA$ (BD1077) exhibió el mismo fenotipo que la cepa $\Delta ctrA\Delta ctrB$ (BD1064), siendo la inhibición incluso algo más extrema. El crecimiento se inhibió un 62.5% respecto al crecimiento normal de la cepa silvestre. Además, el crecimiento de éste no se recupera totalmente hasta que la concentración del medio es de $10 \mu M$ de $CuSO_4$. Como se puede observar, en MMA el crecimiento colonial aún está afectado, observándose una inhibición de un 25% respecto a la cepa MAD1427. Estos resultados indican que MacA es necesario para el crecimiento colonial en condiciones de escasez de cobre y su ausencia muestra un fenotipo más extremo que la ausencia del doble nulo de los importadores.

Con el objetivo de verificar que MacA no está involucrado en los procesos de detoxificación en condiciones de toxicidad de cobre se testó su crecimiento en $200 \mu M$ de $CuSO_4$. Su crecimiento fue analizado con respecto al crecimiento de la cepa nula del factor de transcripción implicado en la detoxificación del catión, la cepa mutante $\Delta aceA$ (BD965). Como se puede observar en la Figura 12 esta cepa muestra una inhibición total del crecimiento en presencia de $200 \mu M$ de $CuSO_4$, mientras que la cepa $\Delta macA$ (BD1077) exhibió un crecimiento similar al de la cepa silvestre.

En conjunto estos resultados indican que MacA es necesario para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* en condiciones de escasez de cobre y que su función no está relacionada con los procesos de detoxificación a altas concentraciones de cobre.

4.3 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MacA

Una vez comprobado que MacA participa en la homeostasis del cobre en condiciones de ausencia del mismo, se prosiguió a verificar, tal y como se ha descrito en otros organismos, que este FT regula la expresión de los importadores de alta afinidad de cobre CtrA y CtrB.

Para ello, en primer lugar, se delecionó el gen *macA* en una cepa que expresaba el importador de cobre de alta afinidad CtrB fusionado a la proteína verde fluorescente GFP (BD879) y que había sido generado por Martzel Antsoetegi. La generación de la cepa se realizó siguiendo el método descrito anteriormente e introduciendo el casete $\Delta macA::pyrG^{Af}$ en la cepa BD879.

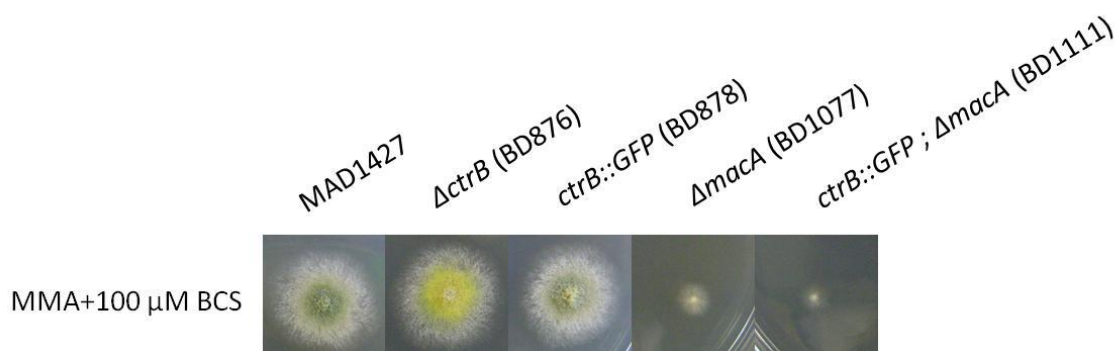


Figura 13. Resultados del estudio de funcionalidad de la proteína *ctrB::GFP*. En él se describe diferentes cepas con la proteína *ctrB* mutada (ya sea creando un mutante nulo o etiquetando la proteína en un fondo nulo de factor de transcripción) y cultivadas en MMA con BCS.

En la Figura 13 quedan resumidos los resultados del análisis funcional realizado a las cepas que contienen la proteína quimérica CtrB::GFP en fondo silvestre y en el fondo nulo $\Delta macA$. La cepa que expresa CtrB::GFP muestra un fenotipo silvestre en condiciones de ausencia de cobre. No exhibe la pigmentación de esporas amarilla característica de la ausencia del transportador CtrB ($\Delta ctrB$), lo que sugiere que la proteína CtrB::GFP es funcional. Y como se puede observar, la delección del gen *macA* en esta cepa (BD1111) exhibió el mismo fenotipo que el anteriormente descrito para $\Delta macA$ e inoculado en este experimento como control (BD1077).

Una vez comprobada la funcionalidad de la quimera CtrB::GFP se procedió a realizar un Western-Blot con el objetivo de analizar la expresión de la proteína CtrB, tanto en la cepa de fondo silvestre (BD879) como en el fondo nulo del gen *macA* (BD1111). Para ello ambas cepas fueron cultivadas en MMA líquido durante 16 h. Tras recoger una primera muestra de micelio (muestra MMA), el inóculo se dividió en dos. A un inóculo se añadieron 100 μ M de BCS y al otro 100 μ M de $CuSO_4$. Ambos inóculos fueron incubados durante una hora.

Como se muestra en el gel de Coomassie de la Figura 14A, de todas las muestras de micelio se extrajo proteína. En el Western-Blot de la Figura 14B se observa que en el fondo silvestre se detectó una banda cercana al tamaño esperado de la proteína CtrB::GFP (~50 kDa). Además de la forma primaria se observan varias bandas de mayor tamaño que podrían corresponder a formas modificadas de la proteína. CtrB::GFP se detectó en todas las condiciones aunque de manera más intensa en la muestra correspondiente a las células incubadas durante 1h con el quelante de cobre BCS y menos intensa tras la adición de cobre. Los resultados obtenidos con la actina, utilizado como control de carga, corroboran estos resultados. En cuanto a la cepa $\Delta macA$, no se detectó expresión de la chimera CtrB en ninguna de las condiciones estudiadas.

Estos resultados corroboran que la proteína MacA es necesario para la expresión de la proteína de alta afinidad de cobre CtrB.

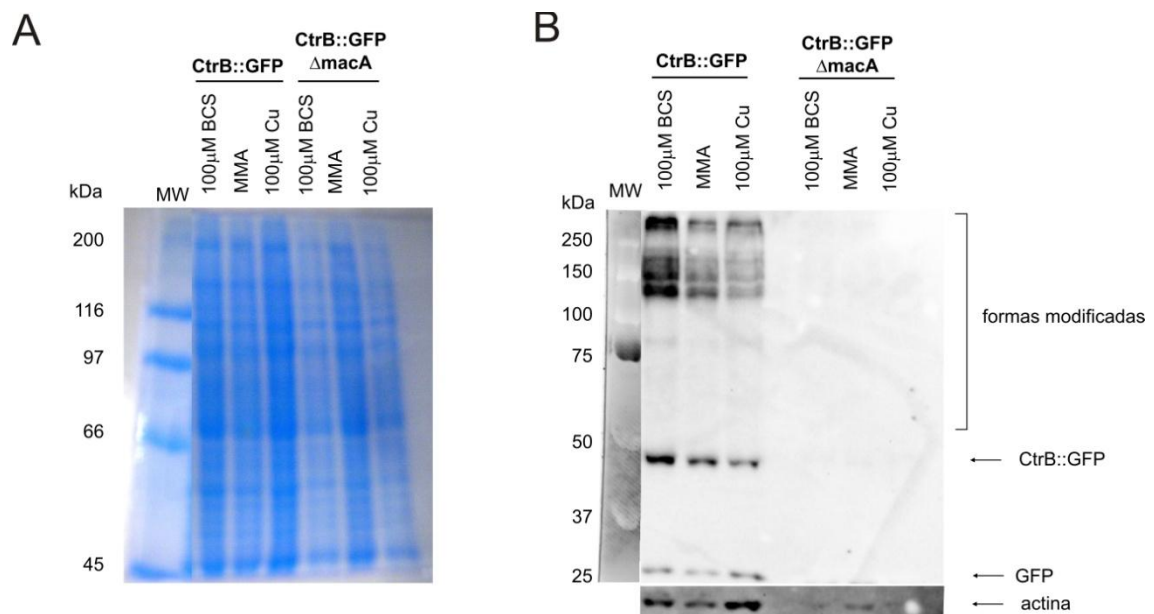


Figura 14. Resultado del estudio de expresión proteica de MacA (A) gel de Coomassie (B) Western-Blot para la detección de CtrB::GFP en un fondo silvestre y fondo $\Delta macA$. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de cobre (MMA + BCS, MMA y MMA + 100 μ M $CuSO_4$) durante 1 h. La actina fue detectada como control de carga.

5. DISCUSIÓN

El estudio realizado sobre *macA* reveló que este gen codifica un factor de transcripción relacionado con la importación de cobre. Este factor de transcripción, junto con el factor de transcripción *AceA*, regulan la homeostasis de cobre en *Aspergillus nidulans*. Es decir, que los sistemas de importación y detoxificación están regulados por dos factores de transcripción, igual que en las especies *S. cerevisiae* y *C. albicans* y a diferencia de *S. pombe* o *C. neoformans* donde los dos procesos son regulados por el mismo factor de transcripción (Beaudoin *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 2000; Woodacre *et al.*, 2008). La implicación de los factores de transcripción en cada proceso ha sido demostrada mediante el estudio de funcionalidad. Mientras que la ausencia de *aceA* causa principalmente un descenso de la densidad celular de la colonia únicamente en presencia de concentraciones tóxicas de cobre, la ausencia de *macA* muestra una severa inhibición del crecimiento colonial solamente en condiciones de escasez de cobre. Esto demuestra que los dos FT tienen distintas funciones, mientras que MacA está involucrado en controlar la importación de cobre, *AceA* controla su detoxificación.

En los hongos hasta ahora estudiados, se ha descrito que la importación de cobre ocurre mediante dos proteínas de importación de alta afinidad denominadas CtrA y CtrB, cuya regulación está controlada por ScMac1p, CaMac1 o AfMacA (Kusuya *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 1998; Woodacre *et al.*, 2008). En *Aspergillus nidulans*, los homólogos de estos dos transportadores han sido identificados por Martzel Antsoategi y han sido denominados CtrA y CtrB. La ausencia de MacA ($\Delta macA$) y de ambos importadores ($\Delta ctrA \Delta ctrB$) muestran un defecto en el crecimiento similar en condiciones de escasez de cobre (MMA y MMA+BCS). No obstante, la inhibición del crecimiento colonial observada en la cepa $\Delta macA$ es más severa que en la cepa $\Delta ctrA \Delta ctrB$, lo que sugiere que MacA controla la regulación de un elemento adicional aún no identificado que participa en el sistema de importación de cobre en *Aspergillus nidulans*. Este elemento podría ser la Cu(II)/Fe(III) reductasa necesaria para reducir el Cu(II) a Cu(I), forma del ion que es interiorizada a la célula tal y como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Peña *et al.*, 1998; Woodacre *et al.*, 2008). Esta reductasa podría ser identificada en *A. nidulans* mediante un análisis de similitud de secuencias, igual que se ha hecho con MacA, de las reductasas ya caracterizadas en otros organismos, como ScFre1p y CaFre1 (Peña *et al.*, 1998; Woodacre *et al.*, 2008). Además, los resultados del RNAseq realizado en el laboratorio en condiciones de exceso de cobre podrían corroborar la identificación. Se prevé que esta proteína, al estar regulada por MacA estará inhibida en condiciones de exceso del cobre.

Mediante el estudio de expresión proteica se ha verificado que MacA regula la expresión de al menos uno de los importadores de alta afinidad de *A. nidulans*, CtrB. Mientras que la expresión de CtrB es detectada en una cepa de fondo silvestre, no es detectada en ausencia de MacA, demostrando así su función como regulador de la expresión de este importador. No obstante, este mismo Western-Blot volverá a realizarse con el objetivo de repetir la detección de la proteína utilizada como control de carga, la actina, dado que su detección en las muestras de la cepa $\Delta macA$ fue inesperadamente baja. Además, se sustituirá la detección de la actina por la hexoquinasa (proteína encargada del proceso de glucólisis), por si la actina (componente del citoesqueleto) estuviera comprometida debido al crecimiento defectuoso de la cepa $\Delta macA$.

Los resultados indican que la cantidad de CtrB en la célula varía dependiendo de la cantidad de cobre existente en el medio. Acorde con su función de importador de alta afinidad, CtrB se expresa más en condiciones de escasez de cobre (MMA+BCS) y menos en presencia de altas

concentraciones de cobre (MMA+100 μ M CuSO₄). Se prevé que esto se deba a un cambio de conformación de MacA tras unirse al cobre del medio, al igual que se ha descrito para *S. cerevisiae* (Peña *et al.*, 1998). Sería muy interesante saber si en estas condiciones en las que el factor de transcripción no está unido al DNA sigue manteniendo su localización nuclear, como ocurre en *C. neoformans* y *S. pombe* (Beaudoin *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011). En condiciones de escasez de cobre CnCuf1 se sitúa en el núcleo, pero en condiciones de exceso, el cambio conformacional del FT tras la unión de los iones provoca el enmascaramiento de la Señal de Localización Nuclear (NLS) y la exposición de la Señal de Exportación Nuclear o NES (L³⁴⁹AALNHISAL³⁵⁸). Esto origina que CnCuf1 cambie de localización y sea exportado al citoplasma por Crm1. Durante el análisis de dominios de MacA se identificó una posible NLS (Lys⁹Arg¹⁷Arg²⁰Lys²³Arg²⁹Lys⁴³) muy similar a la de SpCuf1, pero no una NES. En estos momentos se están realizando búsquedas de posibles NES ricas en leucinas, secuencias reconocidas por KapK, el homólogo de Crm1 en *Aspergillus nidulans*. No obstante, se pretende etiquetar MacA con la proteína verde fluorescente GFP y estudiar su localización en el microscopio en ambas condiciones, en escasez y exceso de cobre.

Como futuro estudio sería interesante comprobar si la expresión de MacA es constante, o por el contrario, cambia dependiendo de los niveles de cobre. Esta cuestión podría ser resuelta estudiando el patrón de expresión de MacA::GFP mediante un Western-Blot o la expresión génica de *macA* mediante un Northern-blot.

6.CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción MacA, codificado por el gen AN0658, está implicado en la homeostasis del cobre.
2. MacA es esencial en condiciones de escasez de cobre.
3. MacA es necesario para que el importador de alta afinidad CtrB se exprese.
4. La expresión de CtrB depende de los niveles de cobre del medio.

6.CONCLUSIONS

1. The transcription factor MacA, encoded by gene AN0658, is involved in copper homeostasis.
2. MacA is essential in conditions of copper depletion.
3. MacA is necessary to express the high affinity importer CtrB.
4. CtrB expression depends on the copper level of the medium.

7. ANEXO TÉCNICO

Conceptos

Gen: Unidad de información en un locus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, o Ácido ribonucleico (ARN) que a su vez codifica una proteína. Es la unidad de herencia molecular.

Promotor: Región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN. Un promotor por lo tanto, promueve la transcripción de un gen.

Factor de Transcripción: Proteína que une secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero.

Transcripción: Primer proceso de la expresión génica, mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN. Durante la transcripción genética, las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa la cual sintetiza un ARN mensajero que mantiene la información de la secuencia del ADN.

Importador de alta afinidad Proteína situada en la membrana plasmática cuya función es la de introducir sustancias o moléculas específicas del exterior de la célula al citoplasma.

Candida albicans es un hongo dimórfico patógeno. Durante la mayoría del ciclo este hongo es levaduriforme pero toma forma filamentosa en el proceso de invasión. Se encuentra en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y en la vagina. Es causante de enfermedades como la candidiasis.

Cryptococcus neoformans es un hongo levaduriforme patógeno. Es causante de enfermedades como criptococosis pulmonar o meningoencefalitis.

Schizosaccharomyces pombe es un hongo levaduriforme no patógena.

Aspergillus fumigatus es un hongo filamentoso patógeno y pertenece al género *Aspergillus*. Es causante de la enfermedad aspergillosis en personas inmunodeficientes.

PCR o Polymerase Chain Reaction es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN. En una primera fase, se desnaturaliza la cadena separando las dos hebras del ADN. En una segunda fase, se unen los oligonucleótidos o *primers* cuyo objetivo es dar un punto de origen a la polimerasa para, en una tercera fase, completarse la copia de ADN. Estas tres fases se realizan a diferentes temperaturas, por lo que la variación de ésta dará comienzo a cada fase. La PCR consta de 20-25 ciclos de las tres fases descritas para obtener así una elevada concentración de fragmentos.

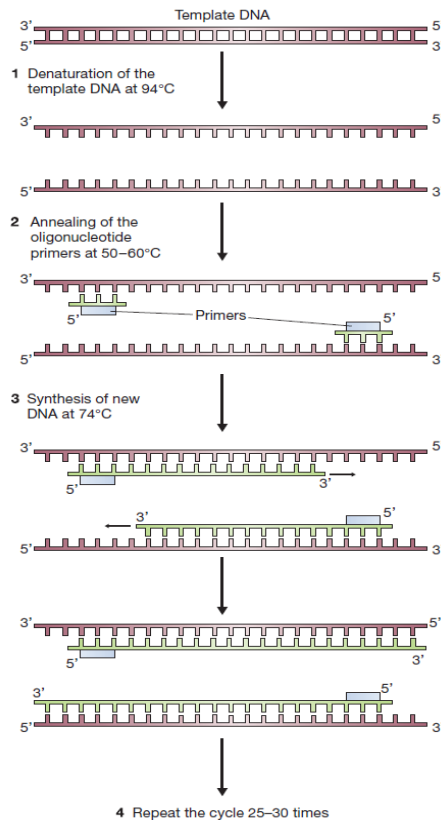


Figura 15. Esquema de las tres fases que forman el ciclo de la PCR

Medio de cultivo: Consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o pequeñas plantas. Según su uso se clasifican diferentes tipos:

- **Medio no selectivo:** Medio en donde crecen todo tipo de microorganismos. Específicamente en este trabajo, el medio no selectivo es aquel que tiene todos los requerimientos para que puedan crecer las cepas.
- **Medio selectivo:** Medio en donde sólo crecen una especie o grupo determinado, es decir, aquel que sea protótrofo para ese medio.

Auxotrofia: Las cepas auxótrofas son mutantes incapaces de sintetizar algún metabolito esencial, por lo que debe añadirse al medio. Las cepas que son capaces de sintetizar todos los metabolitos esenciales, y por lo tanto pueden crecer en medio selectivo se denominan protótrofas.

Transformación: Alteración genética de una célula resultante de la absorción directa, incorporación y expresión de los material genético exógeno (ADN exógeno). El ADN exógeno se encuentra en el ambiente y se introduce a través de la membrana de la célula. La transformación ocurre de forma natural en la mayoría de las bacterias, aunque también se puede efectuar por medios artificiales. Para que ocurra la transformación, la célula debe estar en un estado de competencia, lo que puede ocurrir como una respuesta limitada en el tiempo a las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y una densidad celular elevada.

Protoplastos: Células unicelulares cuya pared celular ha sido degradada. Estas células son competentes para la transformación, ya que la ausencia de pared celular facilita la internalización de nuevo material genético.

Casete génico o de remplazamiento: Producto de fusión del PCR. Este casete es utilizado como ADN exógeno en el proceso de la transformación.

Southern-Blot : Método de biología molecular que permite detectar la presencia de una secuencia de ADN concreta en una mezcla compleja. Para ello se usan tres etapas: separación por longitud, transferencia a una membrana y la hibridación de una sonda marcada complementaria a la secuencia cebo.

Enzima de restricción es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos en una molécula de ADN y cortarla en ese punto en concreto. Hay dos tipos de enzimas de restricción: La enzima exonucleasa reconoce una secuencia situada en el extremo de la molécula de ADN mientras que la enzima endonucleasa reconoce una secuencia situada en el interior de la molécula de ADN.

Western-blot o inmunoblot es una técnica analítica usada para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. La técnica usa tres etapas para lograr esto: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido y, finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados.

Blast: El Blast (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta informática de alineamiento de secuencias, ya sea genómica (Blastn) o proteica (Blastp), en el que se compara una secuencia "problema" contra una y/o una gran cantidad de secuencias depositadas en una base de datos. Esta herramienta posibilita la identificación de candidatos basándose en la similitud de secuencias. Estos resultados se muestran mediante tres factores:

- **Covertura:** Porcentaje de secuencia estudiada y alineada.
- **Valor e:** Indica si el alineamiento es significativo o no. Cuanto menor sea este valor, el alineamiento resulta más significativo.
- **Identidad:** Porcentaje de coincidencia exacta de aminoácidos en la secuencia alineada.

Recombinación homóloga La recombinación genética es el proceso por el cual una hebra de material genético se une a una molécula de material genético diferente. En la recombinación homóloga, esta unión se da en punto específico donde las secuencia de ambos materiales genéticos es idéntica.

Esquema del procedimiento experimental

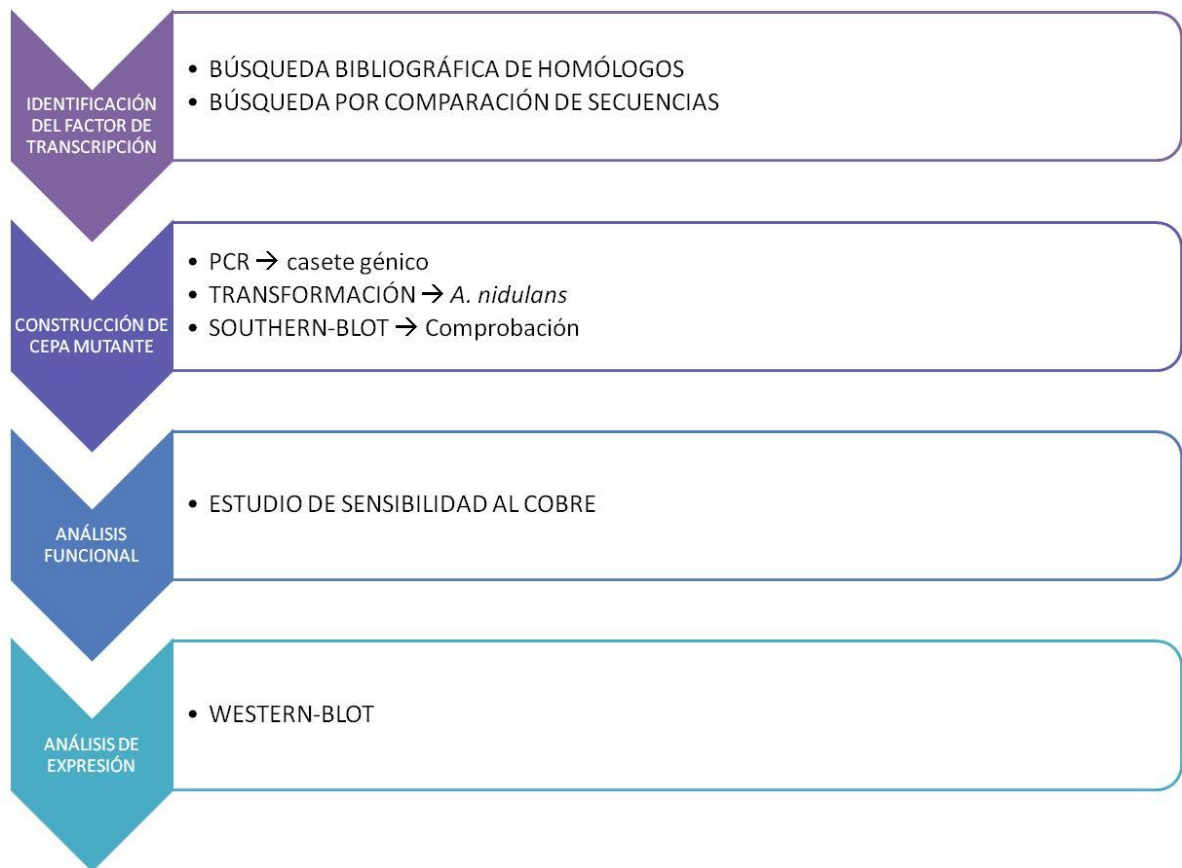


Figura 16. Esquema del procedimiento experimental seguido durante la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Antsotegi-Uskola,M., Markina-Iñarrairaegui,A., and Ugalde,U. (2017). Copper Resistance in *Aspergillus nidulans* Relies on the PI-Type ATPase CrpA, Regulated by the Transcription Factor AceA. *Frontiers in Microbiology* 8, 912.
- Balamurugan,K. and Schaffner,W. (2006). Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 737-746.
- Beaudoin,J., Ekici,S., Daldal,F., Ait-Mohand,S., Guérin,B., and Labbé,S. (2013). Copper transport and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1679-1686.
- Beaudoin,J. and Labbe,S. (2007). Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot. Cell* 6, 764-775.
- Beaudoin,J., Mercier,A., Langlois,R., and Labbe,S. (2003). The *Schizosaccharomyces pombe* Cuf1 is composed of functional modules from two distinct classes of copper metalloregulatory transcription factors. *J. Biol. Chem.* 278, 14565-14577.
- Culotta,V.C., Klomp,L.W., Strain,J., Casareno,R.L., Krems,B., and Gitlin,J.D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-23472.
- Dancis,A., Yuan,D.S., Haile,D., Askwith,C., Eide,D., Moehle,C., Kaplan,J., and Klausner,R.D. (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76, 393-402.
- Ding,C., Yin,J., Tovar,E.M., Fitzpatrick,D.A., Higgins,D.G., and Thiele,D.J. (2011). The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. *Mol. Microbiol.* 81, 1560-1576.
- Gralla,E.B., Thiele,D.J., Silar,P., and Valentine,J.S. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8558-8562.
- Hervás-Aguilar,A. and Penalva,M.A. (2010). Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 9, 1504-1518.
- Jiang,N., Liu,X., Yang,J., Li,Z., Pan,J., and Zhu,X. (2011). Regulation of copper homeostasis by Cuf1 associates with its subcellular localization in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* H99. *FEMS Yeast Res.* 11, 440-448.
- Jungmann,J., Reins,H.A., Lee,J., Romeo,A., Hassett,R., Kosman,D., and Jentsch,S. (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* 12, 5051-5056.
- Kusuya,Y., Hagiwara,D., Sakai,K., Yaguchi,T., Gono,T., and Takahashi,H. (2017). Transcription factor Afmac1 controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.*

- Marvin,M.E., Williams,P.H., and Cashmore,A.M. (2003). The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. *Microbiology* 149, 1461-1474.
- Nevitt,T., Ohrvik,H., and Thiele,D.J. (2012). Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1580-1593.
- Park,Y.S., Lian,H., Chang,M., Kang,C.M., and Yun,C.W. (2014). Identification of high-affinity copper transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal. Genet. Biol.* 73, 29-38.
- Peña,M.M., Koch,K.A., and Thiele,D.J. (1998). Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 18, 2514-2523.
- PONTECORVO,G., ROPER,J.A., HEMMONS,L.M., MACDONALD,K.D., and BUFTON,A.W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141-238.
- Riggle,P.J. and Kumamoto,C.A. (2000). Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J. Bacteriol.* 182, 4899-4905.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2017. New York, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Generic
- Weissman,Z., Berdicevsky,I., Cavari,B.Z., and Kornitzer,D. (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3520-3525.
- Wiemann,P. *et al.* (2017). *Aspergillus fumigatus* Copper Export Machinery and Reactive Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative Antimicrobial Offense. *Cell Rep.* 19, 1008-1021.
- Woodacre,A., Mason,R.P., Jeeves,R.E., and Cashmore,A.M. (2008). Copper-dependent transcriptional regulation by *Candida albicans* Mac1p. *Microbiology* 154, 1502-1512.