

Mecanismos señalizadores y reguladores de la respuesta a estrés abiótico inducido por cationes y la alcalinización del pH ambiental en *Aspergillus nidulans*

Eduardo A. Espeso, Patricia Hernández-Ortiz, Laura Mellado y María Villarino

Centro Investigaciones Biológicas. CSIC. Depart. Biología Celular y Molecular. Madrid

eespeso@cib.csic.es



Foto de grupo. Miembros del grupo en 2013, de izquierda a derecha, Erika Herrero, Patricia Hernandez, Eduardo A. Espeso, María Villarino y Laura Mellado.

Nuestro equipo de investigación está integrado dentro del grupo de Genética Molecular de *Aspergillus* que pertenece al departamento de Biología Celular y Molecular del CIB. Utilizamos *Aspergillus nidulans* como organismo modelo para estudiar diferentes procesos de señalización y respuesta a estímulos ambientales. Analizamos los mecanismos moleculares y celulares tras las respuestas del hongo a estreses abióticos como son las elevadas concentraciones de cationes o la alcalinización

del pH ambiental. En este entorno desarrollamos tres líneas principales de investigación. En primer lugar descifrar cómo la maquinaria de señalización actúa sobre factores transcripcionales (FTs) involucrados en la respuesta a estos estreses, cómo se regula la localización celular de estos reguladores y, con la intención de extrapolar nuestra investigación en un organismo modelo a otros hongos con interés biotecnológico o clínico, el papel de estas rutas de respuesta a estrés en procesos infecciosos.

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso. Las hifas son las células vegetativas y crecen de forma polarizada, pueden alcanzar más de 100 μm de longitud, y el trabajo en el grupo del CIB ha demostrado que dicha forma de crecimiento se basa, al menos, en la distribución de las maquinarias moleculares de los procesos de endocitosis y exocitosis que se encuentran preferentemente localizadas en el extremo de éstas células (Araujo-Bazan *et al.* 2008; Taheri-Talesh *et al.* 2008; Markina-Inarrairaegui *et al.* 2013), es decir en el ápice. Este hongo es un organismo cenocítico. Cada compartimento celular contiene varios núcleos que están sometidos a un estricto control en cuanto a su número y distribución en la célula. En este sistema celular son necesarios unos mecanismos reguladores que permitan que las señales intra y extracelulares sean integradas y que los FTs y otros elementos reguladores implicados en las respuestas a estas señales puedan ser activados y translocados desde largas distancias citoplásmicas a los distintos núcleos en un tiempo adecuado para generar la respuesta biológica.

Hemos estudiado la composición y la distribución de la maquinaria molecular responsable del transporte entre el núcleo y el citoplasma en *A. nidulans* (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). La entrada y salida de moléculas del núcleo ocurre a través de los poros nucleares en un proceso que requiere energía. Entre los diferentes elementos funcionales que han sido definidos en los sistemas de transporte se encuentran los transportadores nucleares que interactúan directamente con las moléculas que van a ser transportadas o cargas. Así, las importinas son los transportadores que median en el proceso de translocación de proteínas y otras macromoléculas desde el citoplasma al núcleo y las exportinas que realizan la función opuesta. Hemos definido el número y función de los transportadores nucleares en *A. nidulans* y determinado su localización celular en interfase y durante la mitosis (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). Algunos de estos transportadores participan en rutas de transporte esenciales para la célula, como el sistema general de importación mediado por la importina $\beta 1$ y α , y el sistema general de exportación mediado por la exportina 1 (Crm1/KapK). Otros transportadores no son esenciales y marcan diferencias con otros sistemas estudiados, indicando que diferentes exportinas e importinas deben estar realizando funciones redundantes. La maquinaria se distribuye regularmente por los diferentes núcleos del sincitio

aunque no es estática y hemos descrito la dinámica de las importinas $\beta 1$ y α a lo largo de la hifa (Etxebeste *et al.* 2013). Además, algunos de estos transportadores parecen estar involucrados en la correcta progresión de la mitosis, en la formación del uso mitótico y el desensamblaje del nucléolo (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011).

En el proceso de transporte y comunicación entre el núcleo y el citoplasma es muy importante la señalización de las cargas por medio de pequeñas señales que permiten su reconocimiento por parte de los transportadores. Estas son las señales de importación nuclear, denominadas NLS, y por otro lado las señales de exportación nuclear, NES. Estas señales median en la localización celular de los FTs y suponen un punto de control muy importante en los procesos de señalización y activación/inactivación de estos reguladores (Bernreiter *et al.* 2007; Araujo-Bazan *et al.* 2009). Estamos estudiando los mecanismos de control de la localización celular de tres FTs, dos de ellos, SltA y CrzA implicados en la respuesta a estrés por cationes y alcalinidad y el factor FlbB que participa en la ruta de diferenciación celular que conduce a la formación de las estructuras de reproducción asexual, los conidióforos (ver Etxebeste *et al.*, 2010).

Los FTs SltA y CrzA median en *A. nidulans* la tolerancia a elevadas concentraciones de cationes mono y divalente (Spiegelvogel *et al.* 2008). En especial CrzA participa en la tolerancia al manganeso y calcio. Hemos estudiado en detalle el proceso de señalización, activación y la distribución celular de CrzA. CrzA es una fosfoproteína y en ausencia de estrés se encuentra fosforilado y excluido del núcleo. El acrónimo Crz indica «calcineurin responsive zinc finger». La proteína fosfatasa calcineurina desfosforila a CrzA cuando se añade calcio al medio extracelular o se estimula la célula y se libera calcio de los compartimentos intracelulares. La actividad fosfatasa de la calcineurina modifica a CrzA y da lugar a su acumulación nuclear (Hernandez-Ortiz and Espeso 2013). SltA es un FT específico de un grupo de hongos filamentosos, el subfilo pezizomicotina. SltA media en la tolerancia a elevadas concentraciones de una amplia gama de cationes mono y divalentes, como magnesio, potasio, litio o sodio. La señalización de SltA es compleja y precisa de un paso de proteólisis que da lugar a una forma truncada que contiene el dominio de unión a ADN. La función de la forma truncada, denominada SltA32kDa, se requiere para la tolerancia a estos estreses. La forma completa, SltA78kDa, tiene también función transcripcional. El estudio del factor SltA nos ha permitido describir el



HUPO
2014 MADRID
13th Human Proteome
Organization World Congress

**The proteome quest
to understand
biology and disease**

October 5 - 8, 2014
Centro de Convenciones Norte IFEMA



HUPO
Human Proteome Organization

EuPA
European Proteome Association

SEPRO
Spanish Proteome Research Organization

JUN 2014

primer «auxótrofo» de calcio, ya que un doble mutante nulo SltA y en la quinasa HalA, implicada en estrés por cationes y homóloga a las quinetas Hal4 y Hal5p de *Saccharomyces cerevisiae*, requiere elevadas concentraciones de calcio para su correcto crecimiento (Findon *et al.* 2010). Además SltA participa en el correcto desarrollo de estructuras de reproducción asexual y en la regulación de la producción de la micotoxina aflatoxina (Shantappa *et al.* 2013).

La señalización de SltA mediante proteólisis recuerda a la del FT PacC que media la ruta de respuesta al pH ambiental y que ha sido estudiada por el grupo durante muchos años (Espeso *et al.* 2000). La activación de la ruta de señalización de PacC es inducida por la alcalinización del medio. La falta de función PacC, su incorrecta señalización o la ausencia de los elementos de señalización, los factores Pal, causa la sensibilidad al pH alcalino. Nuestro trabajo ha demostrado que además de PacC se precisa la función de los factores SltA y CrzA para que *Aspergillus* tolere la alcalinidad (Spielvogel *et al.* 2008). Este hecho indica que el pH alcalino es un estímulo muy importante al que ciertos hongos deben enfrentarse y los que poseen mecanismos moleculares y genéticos que permiten superarlo supone una ventaja sobre otros organismos que compartan nicho ecológico. Esta «ventaja» es explotada por ciertos hongos para medrar en ambientes extremos o causar infecciones tanto en plantas como en animales. Diferentes estudios han demostrado el papel de PacC y sus homólogos en levaduras, RIM101, en virulencia. Nuestro trabajo se está enfocando a los factores CrzA y SltA utilizando el modelo inmunodeprimido murino y *Galleria mellonella*. El papel en virulencia del homólogo de CrzA en *A. fumigatus* ha sido demostrado y pone de manifiesto el valor de la investigación en el organismo modelo y la translación de los resultados a otros hongos de interés. En particular en el proyecto actual nos centramos en estudiar la función de los homólogos de SltA en hongos que atacan frutas recolectadas.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo actual del equipo dentro del grupo de Genética Molecular de *Aspergillus*, dirigido por el Prof. Miguel A. Peñalva, se sustenta sobre el realizado por los diferentes componentes a lo largo de los años y los diferentes proyectos, a todos ellos agradezco su contribución. En especial mencionar la colaboración con el grupo del Prof. Unai Ugalde en la Universidad del País Vasco (EHU). Conjuntamente se han dirigido varias tesis doctorales y muchas

publicaciones en el tema del desarrollo de estructuras de reproducción asexual en *A. nidulans*.

REFERENCES

- Araujo-Bazan L, Dhingra S, Chu J, Fernandez-Martinez J, Calvo AM *et al.* (2009) Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* 46: 506-515
- Araujo-Bazan L, Penalva MA y Espeso EA. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 67: 891-905
- Bernreiter A, Ramon A, Fernandez-Martinez J, Berger H, Araujo-Bazan L *et al.* (2007) Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* 27: 791-802
- Espeso EA, Roncal T, Diez E, Rainbow L, Bignell E *et al.* (2000) On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19: 719-728
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA y Ugalde U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* 18: 569-576
- Etxebeste O, Villarino M, Markina-Inarrairaegui A, Araujo-Bazan L y Espeso EA. (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *PLoS. One.* 8: e85076-
- Findon H, Calcagno-Pizarelli AM, Martinez JL, Spielvogel A, Markina-Inarrairaegui A *et al.* (2010) Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* 47: 647-655
- Hernandez-Ortiz P y Espeso EA. (2013) Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 89: 532-551
- Markina-Inarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-García E, Araujo-Bazan L, Fernandez-Martinez J *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol. Cell* 22: 3874-3886
- Markina-Inarrairaegui A, Pantazopoulou A, Espeso EA y Penalva MA. (2013) The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS. One.* 8: e67154-
- Shantappa S, Dhingra S, Hernandez-Ortiz P, Espeso EA y Calvo AM. (2013) Role of the zinc finger transcription factor SltA in morphogenesis and sterigmatocystin biosynthesis in the fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS. One.* 8: e68492-
- Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P *et al.* (2008) Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 414: 419-429
- Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazan L, Dou X, Espeso EA, *et al.* (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol. Cell* 19: 1439-1449

