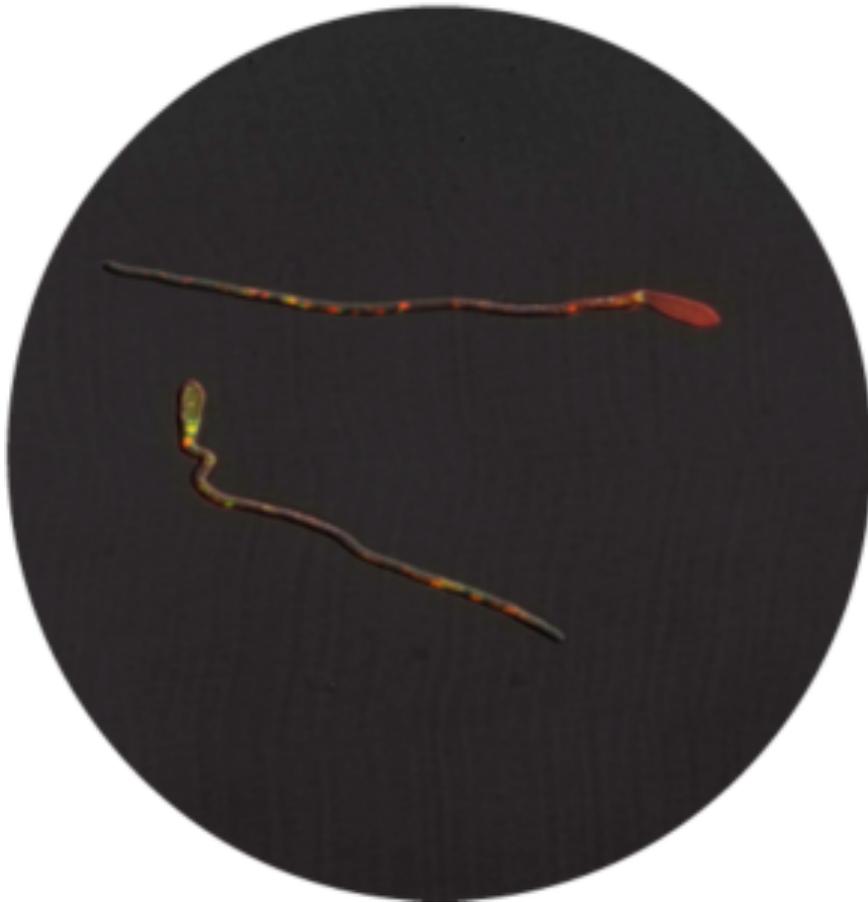


**Papel de la ruta TOR en la formación del
filamento infectivo en *Ustilago maydis*, el
agente responsable del carbón del maíz.**



Tesis Doctoral.

ANTONIO LUIS DE LA TORRE MORILLO

Salamanca, 2018

Departamento de Biología Funcional y Genómica

Instituto de Biología Funcional y Genómica.

(USAL/CSIC)



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**Papel de la ruta TOR en la formación del
filamento infectivo en *Ustilago maydis*, el
agente responsable del carbón del maíz.**

Tesis Doctoral.

ANTONIO LUIS DE LA TORRE MORILLO

Salamanca, 2018

Departamento de Biología Funcional y Genómica

Instituto de Biología Funcional y Genómica.

(USAL/CSIC)

**Papel de la ruta TOR en la formación del
filamento infectivo en *Ustilago maydis*, el
agente responsable del carbón del maíz.**

Memoria presentada por Antonio Luis de la Torre Morillo
para optar al grado de Doctor en Biología.

Director de tesis: prof. Dr. José Pérez-Martín

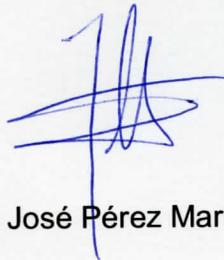
Salamanca, 2018

**JOSÉ PÉREZ MARTÍN, DNI 28473540T, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN
DEL CSIC EN EL INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA
(CSIC-USAL)**

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Papel de la ruta TOR en la formación del filamento infectivo en *Ustilago maydis*, el agente responsable del carbón del maíz” presentada por el Ldo. ANTONIO LUIS DE LA TORRE MORILLO, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y genómica y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante un el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 3 de Septiembre de 2018.



Fdo. José Pérez Martín

*A los “ángeles” que me cuidan
en la tierra y en el cielo.*

Gracias en primer lugar a Pepe, por haber confiado en mí y haberme permitido realizar la tesis doctoral en tu laboratorio. Es necesario agradecerte la alta implicación que has mostrado en este trabajo siguiéndolo día a día, “escuchando” al pesado del becario los múltiples obstáculos que han ido apareciendo durante estos años, ayudándome tanto a nivel intelectual como a nivel manual a resolverlos, enseñándome a mantener la calma y tranquilidad y en definitiva, a QUERER SER CIENTIFICO!!!!. Además de a nivel laboral, también es justo darte las gracias por el trato recibido a nivel personal pareciendo de espaldas al menos un chaval de 49 años!!! pero que de cara, eres como un chaval de 25, con un bromeo constante que no es propio de una relación jefe-trabajador, permitiendo que el trabajo se convierta en casi un hobby.

Realmente también quiero dar las gracias a mi primer grupo científico, PPGs, el cual hizo que me picara el gusanillo de la ciencia y terminara embarcándome en este largo y bonito camino. A Pilar Pérez, por darme la primera oportunidad de realizar ciencia, Rebeca, Nuria, Pedro, Bea, Raúl, Maite y especialmente a Miguel Estravís por perder el tiempo enseñándome en mi etapa inicial cuando estabas terminando una tesis... Ahora sé valorar lo que aquello te supuso, por ello GRACIAS.

A todo el grupo de café, comida y demás amigos del IBFG que con el paso de los años he ido viendo menguar hasta casi ahora ser inexistente, me hacéis desconectar aunque sea por una hora del trabajo, siendo esto tan importante... Por ello, gracias a los viejos y a los nuevos: Marta, Rosana, Sofí, Alicia, Laura, Sara, Sara V, Sandra, Carlos, Paula, Miguel, Clara, Luisa, Camila...(de alguno me olvido, no os enfadéis)

Como no, he de agradecer a mis compañeros de laboratorio las aportaciones y ayudas científicas pero sobre todo, por los ratos con vosotros, las eternas bromas, las risas constantes y el vacile continuo, sino fuera por esos ratos *Ustilago* hubiera terminado conmigo. Gracias a las veteranas María y Sonia, a Sara por tu paciencia infinita aguantando mi incapacidad para estar en silencio, a Luis quien en la etapa final de mi tesis me liberó de trabajo y creó un buen rollito dejando su impronta en el 2.10 con sus míticas frases: “¿Y qué le haces?... Pues vivir con ello” ó “la clase no se negocia, y mucho menos el estilo”... qué tío mas grande eres..., y especialmente a mi Rubia italiana favorita, Paola!!!! GRACIAS por todo, has sido más que una compañera de tesis compartiendo mucho más, buenos y malos momentos, UN PLACER

haber trabajado contigo en la mesa de los ganadores!!! Se me olvida alguien....???? Claro que si!!! MI ADRIAN..!!!! GRACIAS PEQUEÑO SALTAMONTES, eras el pequeño y ahora te has convertido en el grande, eres un tío CRACK, solo te falla que eres del Madrid, COÑO!!!!

*I*gnorante sería también no agradecer a mis amigos de toda la vida, Rodrigo, Bea, Regue, Lidia, Juanma, Manolo, etc (los que faltáis no os enfadéis, sois muchos y no tengo otro libro para nombraros a todos, pero lo compensaré pagándoos unas cañas, lo prometo) porque me habéis escuchado hablar sin entender ni “papa” y asimilado que no es lo mismo que entendido, que este negocio no entiende de parones, en festivo se trabaja, y los “findes” también. Recordad, las células no paran y no esperan, están vivas...!!!! Y como no a mi familia política, Asun y Alex (CUÑAOOO) que me acogieron como un hijo más desde el primer día.

A mis “Padres” a los cuales además de agradecer el infinito apoyo, tengo que agradecer muchísimo más. Por suerte yo he tenido “2 parejas de padres”, en primer lugar agradecer a mis padres verdaderos: **Antonio y Mari C**, espero que estéis orgullosos del éxito conseguido, este trabajo está “multi-dedicado” y una parte es para vosotros. Objetivo cumplido, como os dijeron cuando era pequeño: “este niño podrá llegar a donde quiera”, pues bien llegue a ser Doctor!!! Y todo ello, **GRACIAS a vosotros**. Especialmente a ti, mamá, GRACIAS porque sé lo difícil que ha sido, sobretodo una vez que Papá se tuvo que marchar para no volver. Y ahora gracias a mis segundos padres: **Abuelo y Abuela**, os fuisteis antes de ver terminar este trabajo pero soy como soy gracias en parte a vosotros que me criasteis, me enseñasteis, educasteis y ayudasteis siempre, por ello solo puedo daros las GRACIAS.

*S*i, llego el momento, ya pensabas que me olvidaba de ti ehhhh, cómo me iba a olvidar de la persona que como tu dices estuvo conmigo cuando yo era un Don nadie... (Si lo sigo siendo, ahora solo con un papel más que encima nos costará una pasta..jajaja). No por ser la última eres la menos importante, de hecho quizá sea el AGRADECIMIENTO más importante y más difícil de plasmar, GRACIAS a ti, mi compañera de viajes e historia de mi vida, **MARÍA!!!!** Este trabajo también esta dedicado a tí, porque tu al igual que yo lo has sufrido, escuchando a diario mis historias, aunque solo nos viéramos 30 minutos, sin entender que es AB33, AB34, TOR, Rapamicina, Torin... madre mía que lio entre Carol y Corol!!!! Gracias otra vez por el infinito apoyo, ánimo, esperanza y por compartir este trabajo y mucho más junto a mi.

“Cuando todo se tuerce, tienes dos opciones, rendirte y decidir que llego el final ó sentarte, pensar y solucionar cada problema para llegar al verdadero final.”

RESUMEN:

Un principio casi universal es que los organismos responden a los estímulos exteriores y los integran para dar una respuesta acorde. En el caso de los hongos, esta respuesta resulta de la suma y resta de diferentes estímulos como condiciones ambientales, disponibilidad de nutrientes y en el caso de patógenos, la presencia o no, del organismo hospedador. Al final, el hongo lo que pretende es hacer las cosas lo más correctamente posible desde su punto de vista.

Una pregunta interesante, es qué ocurre cuando recibe información ambiental opuesta a lo que tiene que hacer, y aún así lo hace.

En esta Tesis Doctoral he ha tratado entender como se regula el crecimiento del filamento infectivo que *Ustilago maydis*, el agente causante del carbón del maíz, utiliza para infectar la planta. Este filamento está formado por una única célula que alcanza más de cinco veces su volumen normal, y es necesario para encontrar el lugar desde el cual el patógeno penetra en el interior de la planta. En este trabajo se demuestra que este crecimiento es estrictamente dependiente de la ruta TORC1, algo que es esperable, dado que esta ruta integra la información nutricional, entre otras, y da la luz verde para que la célula crezca. Lo interesante de este caso es qué, en la Naturaleza, este proceso debe ocurrir sobre la superficie de la hoja de maíz, un sustrato no especialmente rico en nutrientes. Y aun así, el hongo debe lanzar a su maquinaria, la orden de crecer. En este trabajo se defiende que para ello, *U. maydis* activa el proceso catabólico de autofagia en respuesta al inicio del programa patogénico, lo cual le permite al hongo obtener nutrientes de una forma independiente a las condiciones exteriores que le permiten mantener la actividad TORC1 elevada, permitiendo de ese modo llevar a cabo el fuerte crecimiento polar para formar el filamento infectivo.

INDICE:

INTRODUCCIÓN

CICLO DE VIDA DE <i>U. MAYDIS</i>.....	2
EL FILAMENTO INFECTIVO.....	5
LA RUTA TOR.....	7
LAS S6 KINASAS	10
TORC1 REGULA EL CRECIMIENTO CELULAR CONTROLANDO LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	12
TOR Y PKA.	13
TOR REPRIME LA AUTOFAGIA.	15
6.- ACTIVACIÓN DE TORC1.....	19
TOR EN HONGOS PATÓGENOS.	25

MATERIALES Y MÉTODOS

1) ESTIRPES Y PLÁSMIDOS.....	29
2) MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	29
2.1.- MEDIOS Y CONDICIONES GENERALES.	29
2.2.- REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS Y SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.....	29
2.3.-PROMOTORES INDUCIBLES Y CONSTITUTIVOS EN <i>U. MAYDIS</i>	29
3) METODOLOGÍA GENÉTICA.....	30
3.1.- CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....	30
3.2.- REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN (PCR).	31
3.3.- EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.	31

3.4.- TRANSFORMACIÓN DE U. MAYDIS.....	32
4) ANÁLISIS DE EXPRESION GENICA.....	32
4.1.- EXTRACCIÓN DE RNA, SÍNTESIS DE cDNA Y PCR A TIEMPO-REAL.....	32
5) MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	33
5.1.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	33
5.2.- WESTERN BLOT.....	34
5.3.- ELIMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN WESTERN BLOTS (STRIPPING).....	34
6) MICROSCOPIA.....	35
7) CONSTRUCCIÓN DE CEPAS EN USTILAGO MAYDIS.....	35
8) TABLAS DE ESTIRPES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.....	56

RESULTADOS

EL COMPLEJO TOR EN U. MAYDIS.....	71
INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA ACTIVIDAD TOR1 EN U. MAYDIS.....	72
LA KINASA TOR1 ES ESENCIAL PARA EL CRECIMIENTO EN U. MAYDIS.....	76
LA KINASA TOR1 ES NECESARIA PARA FORMAR EL FILAMENTO INFECTIVO EN U. MAYDIS.....	80
LA ACTIVIDAD TORC1 ES REQUERIDA PARA LA FORMACIÓN EL FILAMENTO INFECTIVO EN U. MAYDIS.....	85
LOS SUSTRATOS DE TORC1, SCH9 Y AGA1 (S6 KINASAS) SON NECESARIOS PARA UNA CORRECTA FILAMENTACIÓN DEPENDIENTE DEL COMPLEJO B.....	92

TORC1 RESPONDE A CONDICIONES NUTRICIONALES EN <i>U. MAYDIS</i>.	96
LA ACTIVIDAD TORC1 PARECE MANTENERSE ELEVADA DURANTE LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO.....	99
LA ACTIVIDAD TORC1 SE MANTIENE ELEVADA DURANTE LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO AÚN EN AUSENCIA DE ASIMILACIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO.	101
TORC1 EN <i>U. MAYDIS</i> PARECE ESTAR REGULADO DE UNA MANERA SIMILAR A LA DESCRITA EN METAZOOS.	103
LA PRESENCIA DE UN COMPLEJO B ACTIVO NO VUELVE INSENSIBLE A LA RUTA TORC1 A LA FALTA DE FUENTE DE NITRÓGENO.....	108
LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO SE VE COMPROMETIDA EN AUSENCIA DE ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO CUANDO LA AUTOFAGIA ESTA INHIBIDA.....	110
LA AUTOFAGIA ESTÁ INCREMENTADA EN EL FILAMENTO INFECTIVO.	111
LA AUTOFAGIA EN EL FILAMENTO INFECTIVO PARECE SER TORC1 DEPENDIENTE.	114
TORC1 ACTIVA LA AUTOFAGIA A TRAVÉS DE LA S6K AGA1.....	116
LA SOBREACTIVACIÓN DE TORC1 INDUCE AUTOFAGIA DE UNA MANERA INDEPENDIENTE DE LA PRESENCIA DE UN COMPLEJO B ACTIVO.....	117
UNA ACTIVIDAD TORC1 ELEVADA ES PERJUDICIAL PARA LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO.....	119

LA SOBREENPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE PKA GENERA UNA FENOCOPIA DE LOS MUTANTES DE ALTA ACTIVIDAD TORC1 CON RESPECTO A LA FALTA DE CRECIMIENTO POLAR DEL FILAMENTO INFECTIVO.	122
LA REPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD PKA EN AUSENCIA DE TSC2 RESCATA LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO.	125
LOS NIVELES DE PKA CAEN ABRUPTAMENTE DURANTE LA FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO.	127
DISCUSIÓN	130
BIBLIOGRAFÍA.....	143

Abreviaturas:

- **4-OHT:** 4-hydroxytamoxifeno
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **bE:** bEast
- **bW:** bWest
- **Cbx:** Carboxina
- **cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **C-terminal:** Carboxilo-terminal
- **DMSO:** Dimetil- sulfóxido
- **DIC:** Microscopía de contraste diferencial interferencial
- **dNTP:** Desoxirribonucleotido
- **O.D_{600nm}:** Densidad óptica a 600 nm
- **Fig.:** Figura
- **GFP:** Proteína verde fluorescente
- **G418:** Geneticina
- **Gln:** Gutamina
- **h:** Hora
- **Hyg:** Higromicina
- **Kb:** Kilobase
- **kDa:** Kilodalton
- **Leu:** Leucina
- **MMNO₃:** Medio mínimo con nitrato
- **MMD:** Medio mínimo con glucosa
- **Min:** Minuto

- **Nat:** Nourseotricina
- **NH₄:** Amonio
- **NLS:** Señal de localización nuclear
- **NO₃:** Nitrato
- **N-terminal:** Amino- terminal
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PKA:** Proteína kinasa A
- **Pheo:** Fleomicina
- **RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
- **tub:** Tubulina
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico
- **SCS:** Tampon de citrate de sodio-salino
- **YPD:** Medio rico con glucosa

INTRODUCCIÓN

Objetivo principal del trabajo y del modelo de estudio.

La mayor parte de los hongos han diseñado diversas estrategias que les permiten reconocer y penetrar sus hospedadores específicos, que abarcan desde eucariotas inferiores a eucariotas superiores. Estas estrategias de adaptación conllevan un cambio en el ciclo de vida, pasando de vivir de una forma saprofita a una forma patógena, con el fin de superar las barreras de defensa del hospedador para utilizar sus nutrientes, causando así la enfermedad. En el caso de las plantas, los hongos emergen como los causantes de mayores catástrofes, siendo responsables de casi el 70% de las pérdidas de cosechas en el mundo. Paradójicamente, el número de nuevos productos antifúngicos introducidos en el mercado para tratar enfermedades vegetales se está reduciendo debido a la falta de nuevas dianas celulares (Strange and Scott, 2005).

Un gran número de hongos que infectan las partes aéreas de las plantas inician la infección con la germinación de esporas que llegan a la superficie de la planta tras ser dispersadas por el viento. Esta germinación implica la formación, directamente desde la spora o mediante alguna etapa intermedia, de un filamento infectivo, una suerte de hifa especializada gracias a la cual el hongo puede explorar la superficie vegetal buscando el lugar más adecuado para penetrar en el interior del tejido vegetal. Esta etapa es un paso crítico durante la patogénesis de los parásitos invasores de las plantas. Hay que tener en cuenta que una gran diferencia entre los tratamientos antimicrobianos en animales y en plantas es que en este último caso los tratamientos suelen ser preventivos, ya que una vez que el agente infectivo ha penetrado en la planta las posibilidades de erradicar la infección disminuyen drásticamente por problemas de accesibilidad de los agentes terapéuticos al interior de la planta. Ello significa que el periodo de tiempo que transcurre entre el reconocimiento de la superficie vegetal por el patógeno y su penetración dentro de la planta es el periodo de mayor vulnerabilidad para atajar la infección. En otras palabras, el periodo durante el cual se está formando el filamento infectivo es una ventana de oportunidad para combatir la infección y por ello, conocer a fondo este

proceso es crucial para el diseño de nuevas estrategias para luchar contra las infecciones vegetales.

Un potencial problema a la hora de comprender los procesos que ocurren en la fase previa a la penetración en el interior de la planta, radica en que la morfología de las estructuras infectivas es muy variable, así como la manera en que facilitan la penetración de la superficie del hospedador. Sin embargo, a pesar de toda esta diversidad en forma y función, la génesis de dichas estructuras implica en los diferentes hongos algunas características comunes tales como la necesidad de cambios morfológicos precisos como consecuencia de la alteración de los patrones de crecimiento (polar frente a isotrópico) y el reajuste del ciclo celular así como el metabolismo (Perez-Nadales et al., 2014). Por lo tanto, la comprensión de cómo el crecimiento y la progresión del ciclo celular se regulan de forma coordinada durante las primeras fases de la infección podría permitir encontrar vías alternativas para hacer frente a las infecciones fúngicas de las plantas. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado como modelo de trabajo para estudiar estas interacciones el agente responsable de la enfermedad del carbón del maíz, *Ustilago maydis*. Este hongo basidiomiceto crece como una levadura que se divide por gemación, es fácilmente manipulable en el laboratorio, y está considerado como uno de los mejores sistema modelo para entender las relaciones entre el ciclo celular, la morfogénesis y la patogenicidad en hongos fitopatógenos (Steinberg and Perez-Martin, 2008). Esta consideración se debe a un muy buen conocimiento de cómo se controla su ciclo celular y sus conexiones con la morfogénesis (Perez-Martin et al., 2006). Además, la activación del programa de virulencia está asociada al apareamiento de un par de células haploides (mediante unas estructuras sexuales llamadas tubos conjugativos) para producir una hifa dicariótica infecciosa (llamado filamento infectivo). Por lo tanto, este proceso implica fuertes cambios morfológicos (transición de la gema a la hifa), así como cambios genéticos (transición haploide a dicariótica), abogando por un control preciso del ciclo celular, crecimiento y la morfogénesis durante estas transiciones (Perez-Martin, 2012).

Ciclo de vida de *U. maydis*.

Durante la etapa saprófita no patogénica, *U. maydis* vive en forma de levadura haploide, dividiéndose por gemación. Sin embargo, si quiere completar su ciclo sexual necesita de la planta de maíz, ya que en este hongo la virulencia y el apareamiento están fuertemente ligados y de hecho son parte del mismo proceso. *U. maydis* es un hongo heterotálico que porta dos locos de tipo sexual, llamados loci *a* y *b*, siendo ambos necesarios para regular y completar el desarrollo. Mientras que del locus *a* existen dos variedades, *a1* y *a2*, del locus *b* se han descrito hasta la fecha 19 variedades (Barnes et al., 2004). El locus *a* está formado por genes que codifican la producción de feromonas de tipo sexual así como el receptor de la feromona del tipo sexual compatible. El locus *b* lo forma dos genes que codifican factores transcripcionales llamados *bE* y *bW*, que son capaces de formar un heterodímero, siempre y cuando provenga cada subunidad de un tipo sexual diferente.

En la naturaleza, la infección se propaga gracias a esporas diploides fuertemente melanizadas, llamadas teliosporas, que son transportadas por el viento (Fig. 1).

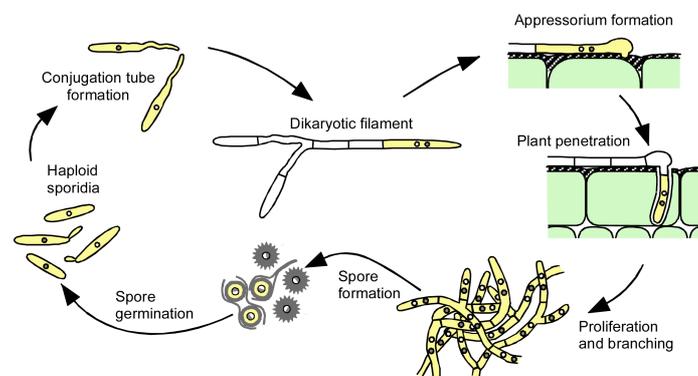


Fig.1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Se muestran esquematizadas las principales etapas del ciclo de vida de *U. maydis*. (Adaptado de (Kammer et al., 2006)).

La infección del maíz por *U. maydis* comienza con la germinación en la superficie foliar de una teliospora, que lleva asociado un proceso de meiosis cuyo resultado es la generación de cuatro células haploides compatibles dos a dos, que se aparean en la superficie vegetal. En este proceso inicial, gobernado por el locus de tipo sexual *a*, dos células compatibles comienzan a

crecer siguiendo un gradiente de feromona formando la estructura sexual denominada tubo conjugativo (Garcia-Muse et al., 2004). Cuando los tubos conjugativos contactan se produce la fusión celular, que se caracteriza por existir únicamente plasmogamia y no cariogamia, dando como resultado final la generación de una única célula dicarionte. A partir de este momento, el control del proceso infectivo pasa a ser llevado a cabo por los factores transcripcionales *bE* y *bW* que han de formar un heterodímero *b* funcional (cada subunidad debe ser aportada por un tipo sexual diferente) (Feldbrugge et al., 2004).

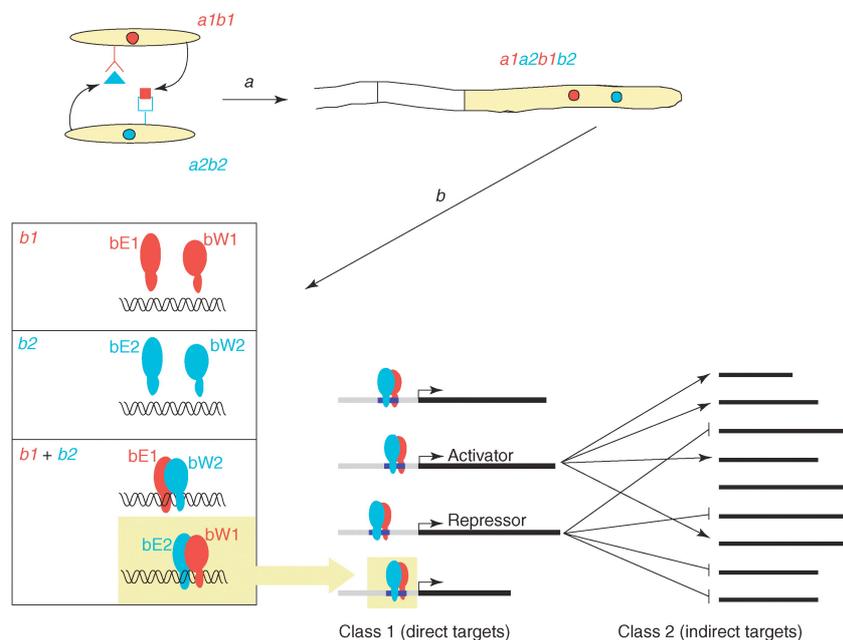


Fig. 2. Procesos moleculares durante el apareamiento. En la parte superior se representa el cambio morfológico de levadura a filamento infectivo, en respuesta al reconocimiento de feromonas (mediado por el locus *a*) y posteriormente por el locus *b*. El locus multi-alélico *b* codifica un par de proteínas que solo son activas como factores de transcripción heterodiméricos cuando las subunidades se derivan de diferentes alelos (abajo a la izquierda). Los heterodímeros *bE/bW* activos provocan una cascada transcripcional a través de activadores y represores que orquestan la red transcripcional de los objetivos aguas abajo (abajo a la derecha). Azul y rojo simbolizan tipos compatibles de apareamiento (adaptado de (Feldbrugge et al., 2004).

La presencia de un complejo *b* activo inicia un programa transcripcional que por una parte detiene el ciclo celular en la fase G2, y por otra activa un fuerte crecimiento polarizado. Todo ello da como consecuencia la producción de un filamento unicelular que se expande mediante crecimiento apical, llamado

filamento infectivo. Este filamento reptar por la superficie de la planta hasta que en respuesta a señales vegetales no totalmente caracterizadas detiene su crecimiento apical. En ese momento empieza a crecer de un modo isotrópico formando una hinchazón en la punta de la hifa que dará lugar a un apresorio que le permite introducirse dentro del tejido vegetal. En esta región se producirá una secreción masiva de proteínas (efectores) destinadas tanto a destruir la cutícula como a señalar e inducir cambios en la célula vegetal que permitirán la posterior invasión del tejido vegetal. Finalmente, en el hongo, el crecimiento apical se restablece pero dirigido hacia el interior de la planta (Perez-Martin et al., 2016) (Fig. 1). La formación del apresorio es imprescindible para que la infección tenga lugar, ya que las cepas mutantes de *U. maydis* incapaces de producir un apresorio funcional son avirulentas (Brefort et al., 2009). Una vez que el filamento infectivo accede al interior de la planta, la parada del ciclo celular es liberada, y así *U. maydis* es capaz de proliferar dentro de la planta. Esta liberación no parece responder a algún requerimiento nutricional y se ha sugerido la existencia de señales específicas de la planta en ello. Como consecuencia de esta proliferación del hongo dentro del tejido vegetal, en las células vegetales se producen fenómenos de hiperplasia y proliferación que dan lugar a los tumores vegetales característicos de esta enfermedad. Dentro de estos tumores, el hongo se desarrolla creciendo de un modo filamentoso. A partir de cierto estadio, los filamentos, que siguen siendo dicariontes, sufren una fragmentación que genera células individuales donde ocurre la cariogamia (Banuett and Herskowitz, 1996). En estas células diploides, se producen cambios morfogénicos tales como el engrosamiento y melanización de la pared celular, dando lugar a las teliosporas, que serán liberadas al viento cerrándose así el ciclo (Banuett, 1995; Lanver et al., 2017) (Fig. 1).

El filamento infectivo.

La formación del filamento infectivo en *U. maydis* es el primer paso en el proceso patogénico y como se ha comentado más arriba depende del factor *b*

que activa una cascada regulatoria que está bien estudiada a nivel molecular (Fig. 3A). Por debajo del factor *b* se encuentran reguladores transcripcionales de segunda y tercera orden tales como Rbf1, Hdp1 o Biz1, cada uno de ellos responsables de la activación y represión de genes implicados en el proceso de formación del filamento infectivo y etapas posteriores (Heimel et al., 2010).

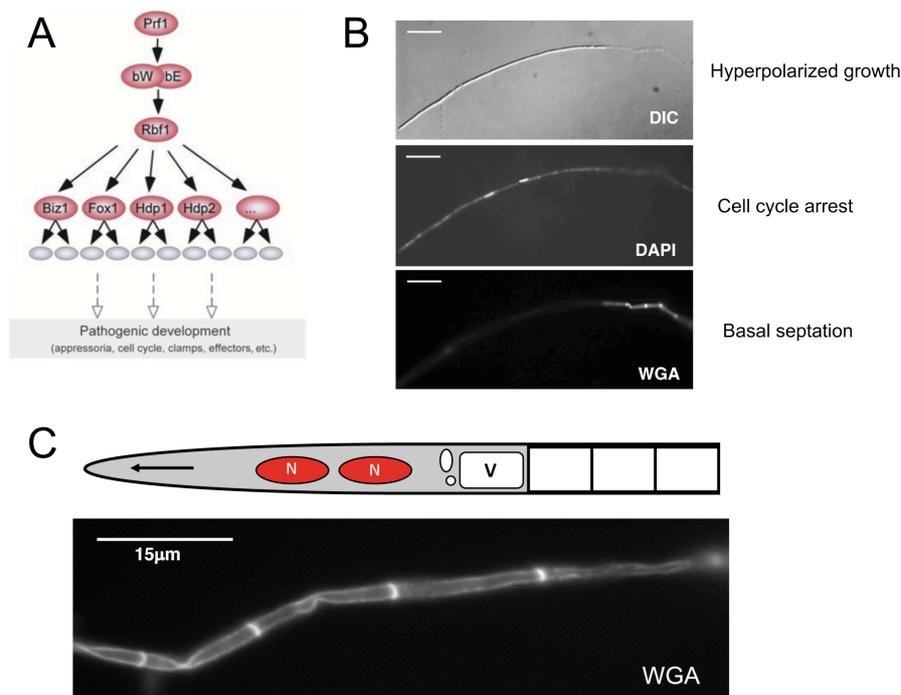


Fig. 3. El filamento infectivo de *U. maydis*. A. Esquema de la cascada transcripcional responsable de la formación del filamento infectivo. Los genes que codifican el heterodímero *b* están inducidos por el factor de respuesta a feromona, Prf1. Por debajo del complejo *b* se encuentra la proteína Rbf1, que a su vez activa la transcripción de una plétora de reguladores, entre los que se encuentran Biz1, Fox1, Hdp1 y Hdp2, así como otros más aún no caracterizados. B. Fotografías de un filamento infectivo centradas en las tres características típicas: la parada de ciclo en fase G2, el crecimiento hiperpolarizado y la formación de septos vacíos basales. C. Esquema de l filamento infectivo haciendo énfasis en la formación de los septos basales. Se muestra un detalle aumentado de la parte basal teñida con aglutinina de germen de trigo (WGA) que tiñe paredes fúngicas.

La principal característica del filamento infectivo es el proceso dual al que está sometido: por una parte, existe una detención específica del ciclo celular en G2 que le impide proliferar y por otra la activación de un fuerte crecimiento polar (Fig. 3B). Como consecuencia de ello, el citoplasma se acumula en la parte apical mientras que las partes más basales de la hifa se vacuolan y se sellan

insertando tabiques regularmente espaciados en el polo distal que resultan en la formación de secciones vacías características, que a menudo colapsan (Steinberg and Perez-Martin, 2008) (Fig. 3C). Este peculiar modo de crecimiento permite que el hongo progrese a lo largo de la superficie de la planta y con ello se incrementa la probabilidad de encontrar un punto de entrada apropiado en la planta. De hecho, mutantes incapaces de mantener este crecimiento apical presentan defectos en su capacidad infectiva.

Estudios de diversos laboratorios han definido los detalles a nivel molecular de muchos de los procesos que dan lugar a la formación del filamento infectivo de *U. maydis*. El patrón transcripcional debajo de las proteínas b es bien conocido (Heimel et al., 2010), también el mecanismo implicado en la parada de ciclo en fase G2 (Mielnichuk et al., 2009), así como reguladores implicados en el fuerte crecimiento polar (Mahlert et al., 2006; Flor-Parra et al., 2007) y en la formación de los septos basales (Freitag et al., 2011). Sin embargo, existe un fuerte desconocimiento acerca de cómo se controla el crecimiento del filamento. Es necesario remarcar que la formación del filamento infectivo se debe principalmente a que el volumen de la única célula que lo compone se incrementa más de cinco veces, pasando del tamaño medio de una célula haploide que es de alrededor de 15 micras a formar un filamento en ocasiones de una longitud superior a 0.1 mm, y todo ello en un corto periodo de tiempo (horas). Este hecho implica que debe existir un fuerte control del crecimiento, pero las claves de dicho control no han sido estudiadas hasta la fecha. Un candidato probable para este tipo de control es la ruta TOR, pero no ha sido caracterizada en *U. maydis*.

La ruta TOR.

La capacidad de una célula para crecer depende del balance entre su actividad catabólica y su actividad anabólica. Este balance obviamente depende de su gasto energético y el aporte de nutrientes. Sin embargo, por encima de este balance existe un circuito genético, muy conservado a escala evolutiva, en el que prima la actividad de un complejo compuesto por una proteína kinasa, llamada TOR y las subunidades encargadas de su regulación.

La proteína TOR es una serina/treonina kinasa pertenece a la familia de proteínas PIKK (quinasas relacionadas a la fosfatidilinositol-3-kinasa) y ejerce un papel fundamental controlando una gran variedad de procesos celulares en respuesta a un amplio espectro de estímulos extracelulares e intracelulares (Shimobayashi and Hall, 2014). Como se ha comentado más arriba, esta proteína esta conservada en la mayoría de organismos eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos (Soulard et al., 2009), aunque existen algunas excepciones donde no ha sido encontrada, correspondiendo estas siempre a parásitos obligados intracelulares que viven en ambientes extremadamente estables como es el interior de un hospedador (Shertz et al., 2010; Tatebe and Shiozaki, 2017).

La kinasa TOR fue descubierta en un análisis genético para estirpes mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a la droga inmunosupresora rapamicina (Heitman et al., 1991) (de ahí su nombre: Target Of Rapamycin). La rapamicina no se une directamente a la kinasa TOR, sino que interacciona con Fpr1 (homóloga de la proteína de mamíferos FKBP12), una prolil-isomerasa, y este complejo interacciona e inhibe la kinasa TOR (Heitman et al., 1991) gracias a la interacción con un dominio de esta kinasa llamado FRB. Los detalles de esta interacción están bien conocidos dado que se ha logrado determinar la estructura molecular del complejo (Heitman et al., 1991).

En la mayoría de los eucariotas, la kinasa TOR forma parte de dos complejos diferentes, denominados TORC1 y TORC2. En el caso de las levaduras de gemación y fisión existen dos isoformas de la kinasa TOR, codificadas por genes independientes (Shertz et al., 2010), y especializadas en cada uno de los complejos TORC1 y TORC2, siendo esta característica especial en estos organismos y probablemente, al menos en *S. cerevisiae*, debida al proceso de duplicación del genoma que estos sufrieron en el pasado (Shertz et al., 2010). Los complejos TORC1 y TORC2 se diferencian en las señales que perciben, en los procesos que regulan y en las proteínas accesorias que los conforman (Fig. 4).

El complejo TORC1 es un módulo de integración de una gran cantidad de información celular y ambiental, incluyendo factores de crecimiento, estrés celular y niveles de nutrientes y energía (Saxton and Sabatini, 2017b). A esta información, TORC1 responde coordinando diferentes procesos asociados al crecimiento celular y proliferación, tales como son la síntesis de proteínas, la síntesis de lípidos, la glicólisis, la biogénesis de mitocondrias y la autofagia (Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018). En el complejo TORC1 la kinasa TOR se encuentra asociada con dos proteínas que forman el núcleo central y que además están conservadas en la escala filogenética: Lst8 (Wat1 en *S. pombe*) que también está presente en el complejo TORC2 y Raptor (Kog1 en *S. cerevisiae*, Mip1 en *S. pombe*) que actúa a modo de andamiaje integrador de las múltiples señales que son recibidas por este complejo. Adicionalmente, existen otras proteínas asociadas al complejo, pero parecen no estar conservadas en todos los sistemas experimentales donde se han estudiado.

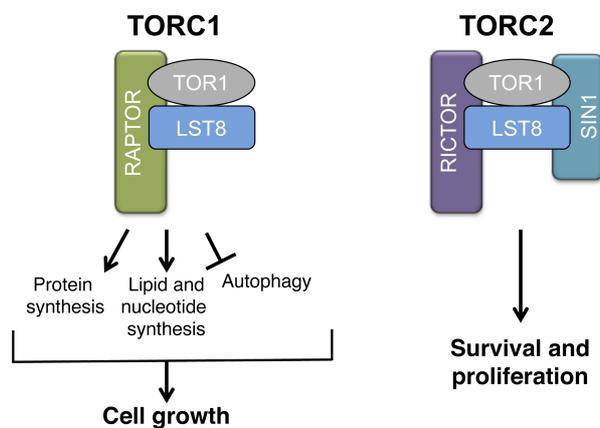


Fig. 4. Las rutas TORC1 y TORC2. Se muestra un esquema de cada una de las rutas con sus componentes centrales, conservados entre los distintos organismos eucariotas.

El complejo TORC2 se encuentra conservado en todos los organismos eucariotas excepto en plantas (van Dam et al., 2011). Frente al papel más uniforme que presenta TORC1 en casi todos los organismos en que se ha estudiado, TORC2 presenta un rango de funciones mucho más variado, en general relacionado con la respuesta a estreses, supervivencia celular y crecimiento. Está constituido por la kinasa TOR asociada a la subunidad reguladora Lst8, así como a dos proteínas que hacen una suerte de andamiaje

integrador llamadas Rictor (*Avo3* en *S. cerevisiae*, *Ste20* en *S. pombe*) y Sin1 (*Avo1* en *S. cerevisiae*). Al igual que ocurre con TORC1 existen otros componentes no totalmente conservados entre distintos sistemas experimentales.

Los complejos TORC1 y TORC2, aparte de su distinta composición y función, presentan una diferente sensibilidad a la droga rapamicina, ya que solo TORC1 es sensible a su inhibición. Esto es debido a que la ubicación de la proteína Rictor enmascara el dominio FRB de la kinasa Tor, de este modo la asociación del dímero Fkbp-12/rapamicina con el dominio FRB se ve impedida y por tanto la inactivación el complejo se encuentra truncada (Gaubitz et al., 2015; Yuan and Guan, 2016; Yang et al., 2017). De hecho, mutaciones que truncan parte de la proteína *Avo3* y exponen el dominio FRB hacen que TORC2 sea sensible a rapamicina en *S. cerevisiae* (Gaubitz et al., 2015).

Como se ha comentado más arriba, no existen estudios previos acerca de la ruta TOR en *U. maydis*. Sin embargo, sí existen varios trabajos de filogenia de la ruta TOR en hongos que incluyen entre las especies estudiadas a *U. maydis* y que proponen genes que codifican para proteínas con alta similitud de secuencia a componentes de la ruta TOR, sugiriendo la existencia en este hongo (van Dam et al., 2011; Tatebe and Shiozaki, 2017).

Las S6 kinasas

Los complejos TORC1 y TORC2 transmiten la información aguas abajo gracias a la fosforilación de proteínas efectoras. Algunas de ellas son dianas finales mientras que en otros casos son otras kinasas las que amplifican y modulan la señal. De entre estas últimas destaca una familia de proteínas kinasas, llamadas S6 kinasas (S6K), que se encuentran muy conservadas evolutivamente.

Las proteínas S6K pertenecen a la familia de las AGC kinasas, a la cual también pertenecen otras kinasas reguladoras de gran importancia celular tales como PKA, AKT, SGK o PKC (Jacinto and Lorberg, 2008). Estas kinasas están altamente conservadas y tienen un papel importante en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Jacinto and Lorberg, 2008). Para su

activación es requerida la fosforilación en el lazo de activación denominado “T-loop” que suele ocurrir bien por autofosforilación o por fosforilación por otras proteínas kinasas. La fosforilación activadora requiere de otra previa que suele darse en un dominio hidrofóbico, llamado dominio HM (motivo hidrofóbico) que estabiliza la conformación y activa alostéricamente la kinasa (Kannan et al., 2007). En el caso de las proteínas de la familia S6K, se ha propuesto que esta fosforilación inicial la lleva a cabo la kinasa TOR, aunque también se han descrito fosforilaciones adicionales en otras regiones (como el llamado “turn motif”), dependiendo del sistema experimental.

En mamíferos se ha descrito una única proteína S6K (p70) y se asume que es diana de TORC1. Se piensa que TORC2 usa otro tipo de kinasas efectoras tales como AKT o SGK. En cambio, en los hongos donde más se ha estudiado estas dos rutas, las levaduras de fisión y de gemación, existen varias S6K asociadas tanto a TORC1 como a TORC2. En *S. cerevisiae* existen tres S6K: Sch9, Ypk1 e Ypk2. La proteína Sch9 es directamente fosforilada por TORC1 al menos en cinco sitios *in vitro* (Jorgensen et al., 2002; Jacinto and Lorberg, 2008). Sch9 es uno de los principales reguladores celulares del inicio de la traducción y biogénesis de ribosomas, y ha sido ampliamente estudiada teniendo papeles relacionados con envejecimiento y crecimiento celular (Jorgensen et al., 2002). Las otras dos S6K, Ypk1 e Ypk2, son sustratos del complejo TORC2 (Kamada et al., 2005; Niles et al., 2012), y están implicadas en la regulación del crecimiento espacial, controlando entre otros elementos el esqueleto de actina (Niles and Powers, 2014).

En *S. pombe* existen tres S6K como dianas del complejo TORC1. La proteína Psk1, la cual presenta mayor similitud con la S6K1 de mamíferos y Sch9 de *S. cerevisiae*, es fosforilada de una forma directa por TORC1 en el motivo hidrofóbico (Thr⁴¹⁵) y en el “turn motif” (Thr³⁹²) de una forma dependiente de nutrientes y sensible a rapamicina (Nakashima et al., 2012). Es considerada la principal efectora de TORC1 y de hecho la interrupción del gen *psk1* genera como resultado defectos en el crecimiento celular (Nakashima et al., 2012). Estos resultados junto con la existencia de un anticuerpo comercial, que detecta las fosforilaciones descritas anteriormente, hacen que Psk1 haya sido

empleado como el principal reportero de actividad TORC1 en *S. pombe*. Además de Psk1, la levadura de fisión presenta otras dos S6K, Sck1 y Sck2, las cuales son fosforiladas por el complejo TORC1 tanto *in vitro* como *in vivo* (Nakashima et al., 2012). Aunque colaboran con Psk1, parecen tener un papel menor y más limitado sobre la regulación del crecimiento. Existe una cuarta S6K, Gad8, que es diana de TORC2 y está implicada en regulación del ciclo celular y resistencia a estrés, así como regulación del esqueleto de actina (Matsuo et al., 2003; Du et al., 2012).

En *U. maydis*, se ha caracterizado una proteína kinasa, llamada Aga1, que por similitud de secuencia podría corresponder al homólogo en *U. maydis* de la S6K Gad8 de *S.pombe*. Aunque su posible imbricación en la ruta TOR es desconocida, merece comentar que esta kinasa es requerida para la virulencia de *U. maydis*, dado que los mutantes de pérdida de función son avirulentos (Berndt et al., 2010).

TORC1 regula el crecimiento celular controlando la síntesis de proteínas.

El complejo TORC1 es el principal regulador del crecimiento celular. TORC1 detecta diversas entradas, como nitrógeno y nutrientes que contienen carbono, estimulación hormonal, diversos estreses, disponibilidad de energía dentro de la célula y oxígeno (De Virgilio and Loewith, 2006). Con toda esta información, TORC1 impulsa el crecimiento promoviendo la traducción de proteínas así la biogénesis de ribosomas (Averous and Proud, 2006; Ma y Blenis, 2009) y la glucólisis (Laplante y Sabatini, 2012), así como suprimiendo las respuestas al estrés (Lopez-Maury et al., 2008) y la autofagia (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009).

La regulación positiva sobre la traducción de proteínas se produce al menos a dos niveles, muy conservados evolutivamente. Por una parte TORC1 fosforila directamente a la proteína 4EBP1 y permite liberar la represión que este sustrato ejerce sobre el factor de iniciación de la traducción eIF4E, provocando esto un incremento en la síntesis de proteínas (Fingar et al., 2002). Un segundo punto de control está mediado por la S6K (p70, Sch9 o Psk1), que

una vez activada por TORC1 fosforila la proteína ribosomal S6 (Rps6), que es una proteína altamente conservada en los organismos eucariotas involucrada en varios procesos celulares relacionados con el crecimiento celular (Meyuhas, 2008).

Adicionalmente, TORC1 activa la síntesis de ribosomas promoviendo la transcripción de los genes ribosomales. Esta regulación tiene varios efectores, muchos de los cuales han sido descritos con cierto detalle, aunque su conservación en la escala evolutiva no está estudiada. En *S. cerevisiae* por ejemplo, destacan el factor transcripcional Sfp1 (Marion et al., 2004) o la chaperona del tipo Hsp70, Ssb1 (Mudholkar et al., 2017) que son fosforilados por Sch9. Existe sin embargo un efector destacado porque parece estar muy conservado evolutivamente llamado Maf1. Esta proteína se une a la RNA PolIII y evita la transcripción de genes que codifican ARNs ribosomales. Maf1 es regulado por TORC1 en mamíferos (se ha propuesto que directamente y también vía S6K) y a través de Sch9 en *S. cerevisiae* (Lee et al., 2009) y en *S. pombe* (Michels et al., 2010; Du et al., 2012). La fosforilación de Maf1 evita su interacción con la RNA PolIII (Oler and Cairns, 2012) obteniendo como resultado un incremento en la transcripción de los genes que codifican para las proteínas ribosomales.

Una manera adicional mediante la cual el complejo TORC1 controla la síntesis de proteínas es a través de la ruta de la protein kinasa A (PKA). Esta ruta controla de manera positiva la síntesis de ribosomas. De nuevo, se conoce con detalle en algunos sistemas experimentales, tales como *S. cerevisiae* (Urban et al., 2007), aunque no queda claro como de conservados están estos mecanismos en otros sistemas experimentales. En *U. maydis* existen trabajos que indican que al igual que en otros organismos, PKA controla positivamente la síntesis de ribosomas (Larraya et al., 2005).

TOR y PKA.

La ruta PKA ha sido muy estudiada en hongos, dado que tiene un papel primordial en morfogénesis así como en virulencia en hongos patógenos. En

hongos, PKA media la mayoría de los efectos fisiológicos del cAMP (D'Souza and Heitman, 2001). PKA se encuentra en la célula formando un tetrámero inactivo compuesto por dos subunidades reguladoras represoras y dos subunidades catalíticas. Cuando los niveles de cAMP celulares se incrementan, se unen a las subunidades reguladoras, separándose de las subunidades catalíticas, las cuales pasan a un estado activo libre pudiendo fosforilar a sus sustratos (D'Souza and Heitman, 2001).

En *U. maydis* esta ruta está también muy conservada y se ha caracterizado a nivel molecular. Existe una subunidad catalítica, codificada por el gen *adr1* y al menos dos subunidades reguladoras codificadas por los genes *ubc1* y *uka1* (aunque esta última parece no ser totalmente funcional) (Gold et al., 1994). Lo que hace especial a esta ruta en el caso de *U. maydis* es su relación con el crecimiento polar. En general, en todos los hongos en los que se ha estudiado, parece haber una relación directa entre alta actividad PKA y promoción del crecimiento polar. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* se ha descrito que la subunidad catalítica Tpk2 se encuentra regulando de forma positiva el crecimiento filamentoso, lo cual se ve apoyado por el fenotipo de crecimiento polar mostrado en los mutantes de delección de la subunidad reguladora Bcy1 (D'Souza and Heitman, 2001). En *Candida albicans* se ha demostrado que la subunidad reguladora Tpk2 es requerida para el proceso de diferenciación a hifa, así el mutante *tpk2/tpk2* presenta la formación de hifas totalmente inhibida. Por el contrario, la sobreexpresión de Tpk2 genera un fuerte crecimiento hifal (D'Souza and Heitman, 2001). En *U. maydis*, sin embargo, desde hace años se conoce que esta relación es negativa (Sanchez-Martinez and Perez-Martin, 2001), y que un incremento en los niveles de PKA conducen a una pérdida total del crecimiento polarizado, como ocurre en el mutante de la subunidad reguladora negativa, *ubc1Δ*, cuya morfología es redondeada. Por el contrario, el mutante de la subunidad catalítica, *adr1Δ*, muestra células que en estado vegetativo presentan un fuerte crecimiento filamentoso (Gold et al., 1994; Durrenberger et al., 1998). La causa última a nivel molecular de esta relación no ha sido caracterizada.

Las rutas de PKA y TOR han sido generalmente consideradas como dos vías

paralelas que perciben las señales de disponibilidad de Carbono y Nitrógeno, respectivamente (Stephan et al., 2010) regulando el crecimiento celular y actuando a veces sobre el mismo tipo de sustratos. Sin embargo, algunos estudios en mamíferos y levaduras han establecido que existe una conexión entre ambas rutas. En mamíferos, ha sido descrito que la ruta PKA es capaz de activar la ruta TORC1 de una forma directa (Mavrakis et al., 2006) a través de la fosforilación de la subunidad PRAS40 del complejo TORC1 (Blancquaert et al., 2010). Además, esta activación también se ha descrito que puede ser llevada a cabo de una forma indirecta a partir de la inhibición que ejerce PKA sobre la ruta AMPK, la cual es un inhibidor de la ruta TORC1 (Djouder et al., 2010). De la misma manera, en *S. cerevisiae* se ha establecido una regulación positiva de la ruta TORC1 sobre la ruta PKA, la cual es llevada a cabo por la proteína Sch9, inhibiendo la MAPK que forma parte de la ruta de Integridad Celular, Slt2, que a su vez se encuentra inhibiendo PKA mediante la fosforilación de la subunidad reguladora Bcy1 (Soulard et al., 2010). En otros sistemas fúngicos, sin embargo, parece que este tipo de relación no está conservada. En *C. albicans*, se ha sugerido que PKA podría estar aguas arriba de TOR regulándolo de manera negativa (Chowdhury and Kohler, 2015), mientras que en *Magnaporthe oryzae*, se ha propuesto que PKA está controlando TOR (Marroquin-Guzman and Wilson, 2015) aunque en ambos casos no se conocen los detalles de dichas interacciones.

TOR reprime la autofagia.

Una de las maneras mediante las cuales la ruta TORC1 favorece los procesos anabólicos es reprimir los procesos catabólicos, y la autofagia es uno de ellos. La autofagia es un sistema de reciclaje de la célula que le permite reutilizar su propio material, de tal modo que algunos componentes citoplasmáticos son internalizados en una estructura de doble membrana denominada autofagosoma, A continuación, esta estructura sufre un proceso de fusión con los lisosomas o vacuolas. formándose el denominado autolisosoma, el cual a través de sus enzimas hidrolíticas degrada los cargos transportados para poder ser reutilizados de nuevo por la célula.

Este proceso requiere de una maquinaria autofágica compuesta por más de 40 proteínas, muchas de las cuales fueron inicialmente identificadas en levaduras y posteriormente en metazoos, plantas y algas (Perez-Perez et al., 2017). Básicamente, un primordio de autofagosoma, llamado fagóforo, comienza a ensamblarse a partir de un módulo que actúa como andamio, formado entre otras por tres proteínas (Atg17, Atg29 y Atg31), y cebado por una serie de complejos de membrana en los que juega un papel primordial la proteína Atg9 (Chen and Klionsky, 2011; Noda, 2017). En la formación de esta estructura primordial, llamada PAS (Phagophore Assembly Site) juega un papel esencial la kinasa Atg1 (Ulk1 en metazoos) que al fosforilar alguno de los componentes del PAS, entre otros, estabiliza el proceso. En algunos sistemas, esta kinasa está regulada por otra proteína, llamada Atg13 que además de modularla la ancla al complejo PAS (Chen and Klionsky, 2011; Noda, 2017). Otros elementos esenciales en el proceso son las proteínas Atg8 (LC3 en metazoos) y Atg12 las cuales decoran por su parte interna y externa el autofagosoma y ambas son requeridas para el sellado y envuelta de los cargos citosólicos en el interior de esta estructura (Chen and Klionsky, 2011; Noda, 2017) (Fig. 5).

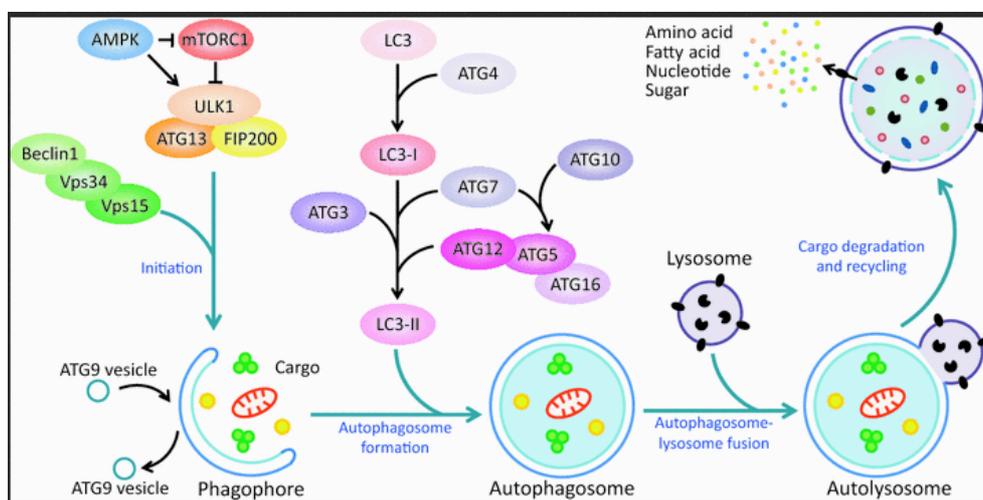


Fig. 5. Autofagia en metazoos. Un resumen esquemático de procesos de autofagia y maquinarias centrales en la formación de autofagosoma. La autofagia, un proceso secuencial, consiste en la iniciación, la formación del autofagosoma, la fusión del autofagosoma-lisosoma y la degradación de la carga, seguida del reciclaje de las macromoléculas. Adaptado de (Cui et al., 2016) .

La autofagia está muy bien regulada y puede ser utilizada de una manera particular para mediar el reciclaje específico de componentes celulares, tales como mitocondrias (mitofagia), peroxisomas, ribosomas, etc, pero también puede utilizarse de una manera general (llamada también macroautofagia). En este último caso suele ser una respuesta a la ausencia de nutrientes, y está fuertemente controlado por la ruta TORC1. Tanto en levaduras, como en mamíferos, se ha demostrado que una inactivación de TORC1 mediante el uso de rapamicina induce la autofagia incluso en condiciones de disponibilidad de nutrientes, indicando que TORC1 se encuentra regulando negativamente este proceso catabólico (Noda and Ohsumi, 1998; Ganley et al., 2009). La inhibición que TORC1 ejerce sobre la autofagia está regulada principalmente a nivel de los primeros pasos en la formación del autofagosoma, aunque los detalles de esta regulación parecen variar de un organismo a otro (Fig. 6).

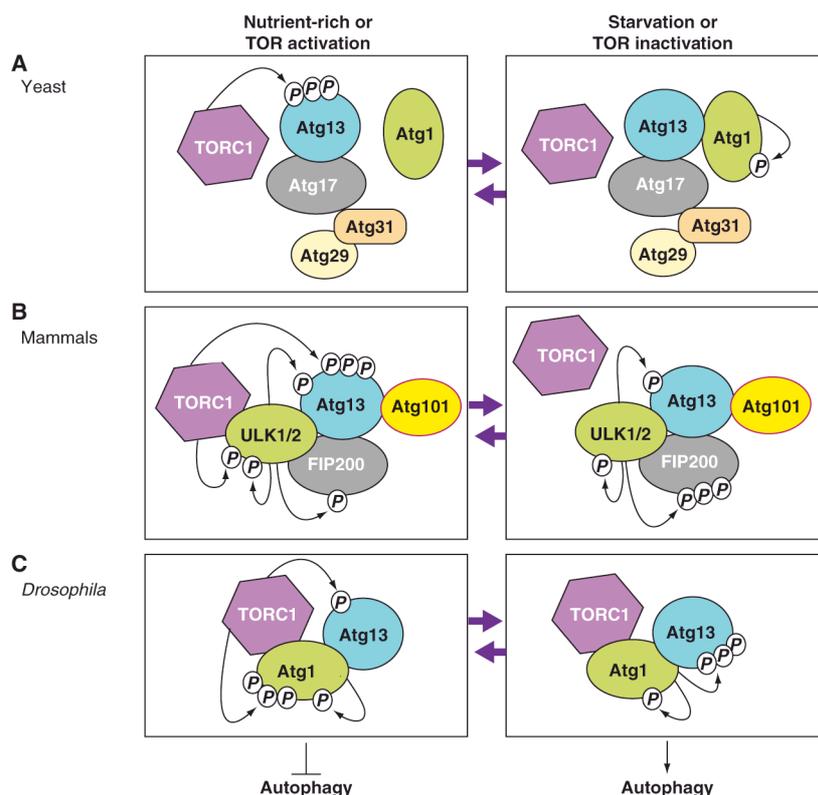


Fig. 6. Conexiones entre autofagia y TORC1 en distintos organismos. Adaptado de (Chen and Klionsky, 2011).

En *S. cerevisiae*, bajo condiciones ricas en nutrientes, TORC1 se encuentra activo e hiperfosforila la proteína Atg13 impidiendo su asociación con la

proteína Atg1 y con componentes del PAS, desencadenando una inhibición de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011). En condiciones que promueven la inactivación de TORC1 (ausencia de nutrientes o tratamiento con rapamicina), Atg13 es desfosforilado y promueve la interacción entre los componentes del PAS y Atg1 permitiendo un incremento de la autofagia (Noda, 2017) (Fig. 6A).

En mamíferos el modelo de regulación que se ha descrito para el control de la autofagia vía TOR es algo diferente al mostrado por levaduras, aunque también parece actuar a niveles iniciales, controlando la actividad de Ulk1. En este caso, el complejo Ulk1 y Atg13, así como la interacción con Atg17 (FIP200) no se afecta por la actividad de TORC1, pero sí su actividad y es que parece que TORC1 lleva a cabo una primera fosforilación sobre ULK1 y una segunda hiperfosforilación sobre Atg13 la cual impide la activación de la autofagia. Por el contrario, en ausencia de nutrientes o cuando TORC1 se vuelve inactivo, la hiperfosforilación ejercida sobre Atg13 por TORC1 desaparece, apareciendo una hiperfosforilación de la proteína FIP200, la cual es llevada a cabo por ULK1 generando como producto final la activación de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011) (Fig. 6B)

En el caso de *Drosophila melanogaster* la regulación que se ha descrito también es diferente, estando el complejo TORC1 unido de una forma constitutiva al complejo Atg1-Atg13 y cambiando el estado de fosforilación de ambas proteínas de una forma dependiente de la actividad TORC1. Así, con un complejo TORC1 activo, ocurre una primera fosforilación dependiente de TORC1 sobre la proteína Atg13 y una segunda hiperfosforilación sobre la proteína Atg1, generándose como resultado la inhibición del proceso catabólico. Por el contrario, cuando TORC1 pasa a estado inactivo, la proteína Atg1 sufre una primera autofosforilación que la vuelve activa e hiperfosforila la proteína Atg13, generando en este caso la activación de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011) (Fig. 6B). Por otro lado, un estudio en *D. melanogaster* ha demostrado que la actividad kinasa de Atg1 no solo estimula la autofagia, sino que además inducen una disminución de la actividad TORC1, observándose como resultado una activación de la autofagia y una disminución del crecimiento celular (Scott et al., 2007). Además, tanto en la mosca de la fruta

como en mamíferos se ha descrito una regulación positiva sobre la autofagia vía S6K a través de la inhibición de la señalización de la insulina (información señalizada a través del complejo Tsc1/Tsc2), la cual puede contribuir al nivel basal de autofagia (Codogno and Meijer, 2005).

Junto con la regulación ejercida a nivel de la formación del autofagosoma, se ha descrito una regulación a nivel transcripcional de algunos genes que codifican para diferentes proteínas de la maquinaria de autofagia, siendo esta regulación TORC1 dependiente. De tal modo que en levaduras un tratamiento con rapamicina o una ausencia de nutrientes, causa la translocación del factor transcripcional Gln3 al núcleo induciéndose la transcripción de un alto número de genes regulados por nitrógeno (Diaz-Troya et al., 2008) entre los cuales se encuentran genes que codifican para proteínas que forman parte de la maquinaria de autofagia como son: Atg1, Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg8, Atg12, Atg13 y Atg14 (Diaz-Troya et al., 2008).

En *U. maydis* se han descrito la presencia de componentes de la ruta autofágica, aunque sorprendentemente no se han encontrado posibles homólogos por similitud de secuencia para proteínas muy conservadas, tales como Atg13 (Liu et al., 2012b). De hecho, tan solo existe un único estudio que indica que los genes de la autofagia son importantes para el desarrollo y la virulencia de *U. maydis* (Nadal and Gold, 2010). Mutantes de pérdida de función en *atg8* y *atg1* evitan la acumulación vacuolar de cuerpos autofágicos y reducen drásticamente la supervivencia bajo condiciones de hambre de carbono. La eliminación de *atg8* afecta la gemación de esporidios haploides, la formación de tumores y la producción de teliosporas. En cambio, los mutantes de delección de *atg1* son solo un poco menos patogénicos que el tipo salvaje, y la producción de teliosporas no se ve afectada (Nadal and Gold, 2010).

6.- Activación de TORC1.

La activación del complejo TORC1 ocurre principalmente en respuesta a tres factores principales: disponibilidad de aminoácidos, factores de crecimiento y el estado energético de la célula (Zinzalla and Hall, 2008). Toda esta información

es integrada a través de un ingenioso sistema que incluye varios puntos de regulación, y cuyos detalles parecen ser diferentes entre metazoos y los hongos estudiados hasta la fecha.

La proteína Tor1 asociada al complejo TORC1 tiene una actividad kinasa intrínseca muy baja, debido a un mal alineamiento de los aminoácidos que componen el sitio activo. Para lograr un sitio activo adecuado, debe sufrir un cambio conformacional que es proporcionado por la interacción de la proteína Rheb1 (Yang et al., 2017). La GTPasa Rheb1 es por ello el principal activador de TORC1, y se encuentra presente en muchos organismos eucariotas pero no en todos, como por ejemplo en *Candida glabrata*, *Trypanosoma brucei* ó *Pichia membranifaciens* (Tatebe and Shiozaki, 2017) . En *S. cerevisiae* aunque existe una proteína con alta similitud de secuencia a la proteína Rheb1, Rhb1, no es un homólogo funcional de Rheb1 ya que en este organismo esta proteína no se encuentra regulando la kinasa TOR sino que esta implicada en la regulación del reciclaje de endosomas tardíos (Kama et al., 2007). Es posible que en la levadura de gemación, así como en otros organismos independientes de la función Rheb1, mutaciones en la kinasa TOR compensen la falta de la proteína funcional Rheb1, como han sido descritas en mutantes Rhb1-independientes en *S. pombe* (Urano et al., 2007).

Rheb1 pertenece a la familia de proteínas Ras y como todas las GTPasas cicla entre un estado inactivo, unida a GDP y un estado activo, unida a GTP, siendo este último en el único estado que puede estimular la actividad TORC1 a través de su interacción directa con la subunidad reguladora Lst8 y quizás con Raptor (Dibble and Cantley, 2015). En metazoos, Rheb1 se localiza en la membrana de lisosoma (Sancak et al., 2008). El único regulador negativo descrito hasta el momento de Rheb1, es el denominado complejo TSC. En mamíferos está compuesto por las proteínas Tsc1, Tsc2 y TBC1D7 (van Slegtenhorst et al., 1998; Dibble et al., 2012) y la pérdida de cualquier componente del complejo se traduce en un incremento de la actividad TOR (Dibble et al., 2012). La proteína principal del complejo es Tsc2, que contiene el un dominio GAP que es esencial para promover la actividad GTPasa de Rheb1, inactivándolo. La función de las otras proteínas, especialmente Tsc1, parece ser estabilizar Tsc2

y servir de entrada de información (Tee et al., 2003). El complejo TSC durante la evolución se ha perdido totalmente en muchos organismos eucariotas y en otros se ha conservado total ó parcialmente, siendo la proteína Tsc1 el componente menos conservado (Tatebe and Shiozaki, 2017). En mamíferos, este complejo canaliza diversas señales como son los niveles de energía intracelular (mediante la fosforilación por AMPK), factores de crecimiento, citoquinas e incluso niveles de hipoxia (Huang and Manning, 2008; Aramburu et al., 2014).

Como se ha comentado más arriba, Rheb1 es una proteína localizada en la superficie del lisosoma, mientras que, al menos en metazoos, TORC1 no se localiza en condiciones de no activación en el lisosoma. Este hecho permite que la información nutricional, principalmente la presencia de aminoácidos, se pueda integrar en la regulación del complejo TORC1, y es que, de una manera muy resumida, es la presencia de aminoácidos lo que permite el anclaje del complejo TORC1 en la superficie del lisosoma y su activación por Rheb1 (Sancak et al., 2008). Este anclaje es proporcionado por unas proteínas denominadas RagA, RagB, RagC y RagD que son GTPasas que interaccionando directamente con Raptor y lo mantienen en la membrana del lisosoma, generando de este modo, una cercanía física entre TORC1 y su principal activador, Rheb1 (Sancak et al., 2008; Sancak and Sabatini, 2009; Efeyan et al., 2013). Las proteínas Rag forman un heterodímero compuesto por RagA o RagB al que se une RagC o RagD (Kim, 2009). Este heterodímero esta anclado al lisosoma gracias a la interacción con un complejo proteico denominado Ragulator, el cual esta compuesto por el quinteto de proteínas: LAMTOR1, LAMTOR2, LAMTOR3, LAMTOR4 y LAMTOR5 (Sancak et al., 2010). Importantemente, aunque las proteínas Rag son GTPasas, su nivel de ocupación por GTP o GDP determinan su capacidad para anclar a TORC1 (Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018). Para ser activo, RagA/RagB se tiene que encontrar asociado con GTP mientras que RagC/RagD debe estarlo con GDP (Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018). El complejo Ragulator actúa como GEF de RagA/B favoreciendo el intercambio de GTP por GDP, y en ello está ayudado por la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) en presencia de aminoácidos

(Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018). Por otra parte, la actividad GTPasa de RagA/RagB se potencia en presencia de un complejo denominado GATOR1, el cual esta presente en la mayoría de los organismos eucariotas con la única excepción de algas verdes y plantas (Baker et al., 2016) y que está compuesto por el trímero de proteínas DEPDC5, Npr12 y Npr13. Este complejo interacciona directamente con RagA/B actuando como un GAP, promoviendo su inactivación y la consecuente supresión de la actividad TORC1 (Bar-Peled et al., 2013; Panchaud et al., 2013). La actividad de GATOR1 está a su vez regulada negativamente por otro complejo, denominado GATOR2, el cual esta compuesto por el quinteto de proteínas siguiente: Mios, WDR24, WDR59, SEH1L y SEC13 (Bar-Peled et al., 2013; Panchaud et al., 2013). GATOR2 está activo si existen aminoácidos y es la manera en la que la información nutricional llega al complejo TORC1. Distintas proteínas, que actúan a modo de sensores específicos de aminoácidos interactúan de una manera u otra con algunos de estos complejos reguladores situados aguas arriba del complejo Rag, y los detalles se van conociendo en la actualidad. Por ejemplo, hay un grupo de proteínas, llamadas sestrinas que inhiben la actividad de GATOR2 (e indirectamente de TORC1) pero que al reconocer aminoácidos libres específicos (Leu, Met, Ile) dejan de actuar como inhibidores (Chantranupong et al., 2014) (Fig. 7).

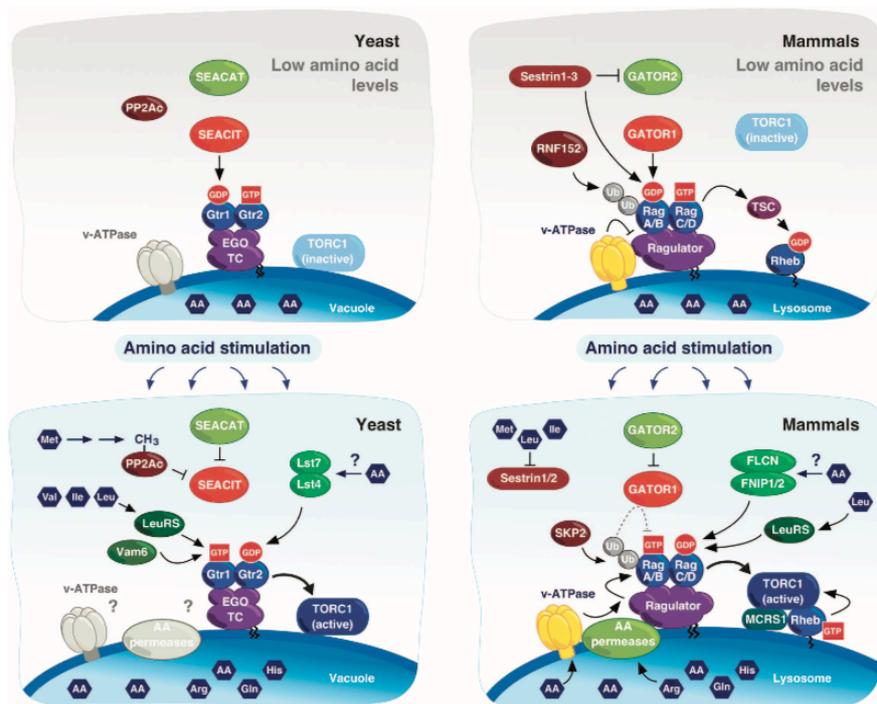


Figura 7. Regulación de TORC1 en mamíferos y levaduras. Adaptado de (Powis and De Virgilio, 2016).

Estudios en las levaduras de fisión y gemación, han indicado también la existencia de complejos más o menos similares a los descritos en metazoos, aunque la complejidad parece menor. Los homólogos a RagA/B y RagC/D se llaman Gtr1 y Gtr2, respectivamente, y al igual que en metazoos su ocupación por GTP y GDP es determinante para su actividad. Existe una suerte de Ragulator, cuyos componentes no están conservado a nivel de secuencia aminoacídica. En *S. cerevisiae* es el complejo EGO (compuesto por Ego1-3) (Powis et al., 2015), mientras que en *S. pombe* este complejo está compuesto por cuatro proteínas llamadas Lam1-4 (Chia et al., 2017). El papel de estos complejos es similar al descrito en metazoos y es básicamente anclar el heterodímero de Gtr1/Gtr2 a la vacuola, estructura con función similar al lisosoma de mamíferos (Binda et al., 2009). La ATPasa vacuolar no se ha descrito que tenga un papel como GEF de Gtr1 (aunque si parece actuar de alguna manera sobre Gtr1 en respuesta a pH en *S. cerevisiae*, (Saliba et al., 2018) , pero en cambio un componente del sistema de fusión vacuolar, Vam6, parece actuar como GEF tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe* (Valbuena et al., 2012; Powis and De Virgilio, 2016). Existe también un complejo similar a

GATOR1, llamado SEACIT en *S. cerevisiae*, y compuesto por las proteínas homólogas respectivas compuesto por Iml1, Npr2 y Npr3 en ambas levaduras. De igual manera existe una suerte de GATOR2 (SEACAT en *S. cerevisiae*) compuesto igualmente por proteínas homólogas a las de metazoos (algunas de ellas conservadas a nivel de secuencia aminoacídica). En resumen, en los hongos estudiados sí parece que existan todos los complejos principales que existen en metazoos. Sin embargo, hay diferencias notables a la hora de entender como funcionan estos complejos y su conexión con TORC1. La primera, y muy importante, es que mientras que en metazoos el anclaje de TORC1 en la superficie del lisosoma determina su activación, en levaduras, TORC1 parece estar siempre asociado a la vacuola. En el caso de *S. cerevisiae*, la manera de asociarse en la vacuola varía entre las condiciones nutricionales óptimas o adversas. En condiciones de limitación de aminoácidos, TORC1 parece asociarse en un único punto de la vacuola, formando un foco, mientras que en condiciones de presencia de aminoácidos se distribuye uniformemente por la superficie de la vacuola (Varlakhanova et al., 2017). Esto no se ha descrito en el caso de TORC1 en *S. pombe* (Valbuena et al., 2012). También hay que recordar que en *S. cerevisiae* la kinasa TOR no requiere de Rheb1 para ser activada ya que esta GTPasa tiene una función diferente estando involucrada en la regulación de resistencia a canavanina y en la captación de arginina (Urano et al., 2000; Gonzalez and Hall, 2017; Nicastro et al., 2017), mientras que en *S. pombe* este requerimiento sí existe (Urano et al., 2007; Otsubo and Yamamoto, 2008). De manera análoga, existe un complejo TSC en *S. pombe* pero no en *S. cerevisiae* (Tatebe and Shiozaki, 2017). Otra diferencia importante es el papel esencial en la activación de TORC1 por parte del complejo Rag en metazoos, mientras que Gtr1 y Gtr2 son dispensables en levaduras, siendo el efecto de su pérdida de función más o menos notable según el organismo y las condiciones. En el caso de *S. cerevisiae*, se ha descrito una segunda posible manera de activar TORC1 mediante la proteína Pib2, de tal suerte que mutantes dobles en *gtr1* y *pib2* no serían capaces de crecer (Varlakhanova et al., 2017; Ukai et al., 2018). No se ha descrito un equivalente en *S. pombe* y por lo tanto no está claro que este esquema regulatorio sea exportable a otros sistemas fúngicos. Los estudios realizados

hasta la fecha sugieren que la forma de modular TORC1 en hongos parece ser casi específica de especie. Parecen tener más o menos los mismos componentes, pero como los conectan es algo más específico. En *S. cerevisiae*, donde la actividad kinasa TOR parece ser constitutiva, su capacidad para señalar aguas abajo depende de su estado de agregación y esto viene determinado tanto por el complejo Gtr1/Gtr2 y sus reguladores superiores (SEACAT y SEACIT) como por Pib2 (Fig. 7). En *S.pombe*, sin embargo se ha propuesto un modelo de regulación negativa: TORC1 estaría activándose continuamente por Rheb1 en la superficie de la vacuola (que a su vez recibiría información no totalmente definida a través de TSC) y el complejo Gtr1/Gtr2 realmente actuaría como modulador negativo, atemperando los niveles de TORC1 dependiendo del grado de ocupación de Gtr1 por GDP que a su vez vendría determinado por nivel de aminoácidos (vía el complejo análogo a GATOR1) (Chia et al., 2017).

TOR en hongos patógenos.

Como se ha mencionado anteriormente existen varios trabajos de filogenia de la ruta TOR, los cuales han permitido establecer que dicha señalización se encuentra altamente conservada en hongos (van Dam et al., 2011; Tatebe and Shiozaki, 2017). Sin embargo, a pesar de ser una ruta esencial en cualquier célula eucariota, los estudios encaminados a caracterizar la ruta TOR en hongos más allá de los sistemas modelo de levadura de fisión y de gemación, han sido escasos. Importantemente, en hongos patógenos, una conclusión general obtenida en los casos que se describirán con más detalle a continuación, es que no hay reglas comunes y que la ruta TOR puede estar jugando papeles ambivalentes durante los procesos infectivos

En el apartado de hongos patógenos de humanos, el trabajo realizado en *C. albicans*, ha indicado que esta ruta se encuentra regulando la expresión de genes involucrados en la respuesta a baja disponibilidad de nitrógeno, la biogénesis de ribosomas, la biosíntesis de aminoácidos y la traducción de proteínas (Bastidas et al., 2009). La formación de la hifa sobre superficies semisólidas o durante la infección del hospedador, es decir elementos

importantes durante la patogénesis del hongo, también están regulados de una forma positiva por la vía TOR (Bastidas and Cardenas, 2010). En concordancia con un papel positivo de la ruta TOR durante la virulencia, se ha descrito que la pérdida de función de Sch9, una de las S6 kinasas controladas por TORC1, genera una disminución en el tamaño celular y una menor virulencia (Liu et al., 2010) siendo este mismo resultado observado cuando ocurre la inhibición de la ruta mediante rapamicina ó en ausencia de nitrógeno. Sin embargo, no todo indica este papel positivo en virulencia. Por ejemplo, TORC1 regula negativamente la expresión de genes específicos para la formación del biopelículas como son los genes que codifican adhesinas y aglutininas (Bastidas et al., 2009). En otras palabras, la adherencia colectiva entre células para formar la biopelícula ocurre cuando la actividad TOR esta disminuida siendo esto un requisito importante para la colonización de un nuevo nicho que le permita al hongo invadir y proliferar dentro de los órganos internos del hospedador.

En hongos fitopatógenos tampoco el panorama está claro, salvo ciertas excepciones. El estudio de esta señalización en hongos fitopatógenos no es muy extenso y no existe una gran cantidad de información de esta ruta en este tipo de hongos. Así, la adición de Rapamicina al patógeno del trigo y la cebada *Fusarium graminearum* genera una inhibición del crecimiento de la hifa, un incremento en la expresión de genes implicados en la asimilación de nitrógeno alternativo, un aumento de la septación y síntesis de lípidos en la hifa, indicando todo ello que la ruta TOR regula negativamente la formación del septo, la integridad de la pared celular y el metabolismo de lípidos. Además, el descenso de la actividad TOR como en el resto de organismos eucariotas, ocasiona un incremento en el nivel de autofagia en la hifa, lo cual sugiere que la regulación negativa que esta señalización ejerce sobre la autofagia se encuentra conservada en *F. graminearum* (Yu et al., 2014). Por otro lado, al igual que en hongo patógeno de humanos *C. albicans*, la pérdida de función de Sch9, se traduce en una menor tasa de crecimiento celular y una menor virulencia como consecuencia de la disminución de la expresión del factor de virulencia DON (Chen et al., 2014). Además, la pérdida de este efector también

genera una mayor sensibilidad a diferentes tipos de estreses y una producción de conidios mas pequeños (Chen et al., 2014).

En el caso del patógeno del tomate *Fusarium oxysporum* se ha establecido que la ruta TOR regula negativamente la fusión celular, la adhesión patógeno-hospedador y la expresión de diferentes tipos de genes (tales como genes específicos de hifa que promueven la interacción célula-célula, genes para la asimilación de nitrógeno como el que codifica para la amonio permeasa y genes específicos de virulencia como por ejemplo *six1*, el cual se encuentra estimulado en condiciones limitantes de nitrógeno permitiendo el crecimiento invasivo del hongo) (Lopez-Berges et al., 2010).

Por último, en *Magnaporthe oryzae* se requiere una inhibición de la ruta TOR para la formación de la estructura específica necesaria para la infección denominada apresorio, y ha sido observado que una elevada actividad TOR genera diferentes rondas de mitosis y un descenso de la autofagia, la cual es necesaria para la formación de dicha estructura (Marroquin-Guzman and Wilson, 2015; Marroquin-Guzman et al., 2017). Por tanto, la formación del apresorio requiere la disminución de la actividad TOR y como consecuencia se ha observado una inhibición de la germinación de las esporas, una represión de la expresión de los genes ribosomales por ejemplo RS2 y RS3 y un incremento de la autofagia. Sin embargo, la eliminación del sustrato de TOR denominado Sch9 genera una disminución tanto de la conidiación como del tamaño del apresorio lo cual se traduce en un descenso de la capacidad infectiva del hongo (Marroquin-Guzman and Wilson, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS.

1) ESTIRPES Y PLÁSMIDOS.

Todas las estirpes de *U. maydis* empleadas en este estudio han sido listadas en la tabla 1, en la cual se representa el nombre, genotipo y referencia (ver al final de la sección).

2) MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

2.1.- Medios y condiciones generales.

Todas las cepas de *U. maydis* fueron crecidas en medio rico peptona (YP) o medio mínimo nitrato (MMNO₃) donde las fuentes de carbono (glucosa (D) o arabinosa (A)) se añadieron tras ser autoclavados a una concentración final del 2 %.

Los cultivos líquidos fueron incubados a 28°C con una agitación constante de 250 rpm bajo unas condiciones de aireación óptimas (el volumen nunca fue superior a 1/5 del volumen máximo del recipiente) hasta obtener una D.O_{600nm} = 0.8 – 0.6 (fase exponencial). Los cultivos sólidos fueron crecidos en placas incubadas en una estufa a 28°C.

El cultivo de *E. Coli* DH5α se realizó a 37°C en medio Luria (LB) suplementado con Ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

2.2.- Regeneración de protoplastos y selección de transformantes.

Los protoplastos fueron regenerados en agar de regeneración suplementado con sacarosa como fuente de carbono. Para permitir la selección de transformantes fueron empleados los antibióticos: Higromicina B (200 µg/ml), Carboxina (2µg/ml), Nouseotricina (150 µg/ml) y G418 (500 µg/ml). Las placas de agar de regeneración fueron hechas en dos capas, una inferior suplementada con el doble de concentración de antibiótico correspondiente y otra superior con solo agar de regeneración.

2.3.-Promotores inducibles y constitutivos en *U. maydis*.

Para controlar la expresión de los genes, los promotores inducibles empleados fueron P_{arg1}, el cual esta activo en presencia de arabinosa y reprimido en

presencia de glucosa. P_{nar1} , inducible con nitrato y reprimible con amonio o medio YP. Otro promotor inducible usado fue P_{dik6} , el cual es solo activado en presencia del heterodimero *bW-bE* (Flor-Parra et al., 2006). Para la expresión constitutiva de genes el promotor empleado fue P_{tef1} .

Para los experimentos de inducción, las células fueron crecidas en medio represor hasta alcanzar una $D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$, se lavaron 2 veces con agua Mili-Q estéril y una vez con medio inductor para finalmente trasladarse a medio inductor ajustando la $D.O_{600nm} = a 0.3$.

Para los experimentos de represión, se crecieron las células en medio inductor hasta alcanzar la misma $D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$, fueron lavados 2 veces con agua Mili-Q estéril y una vez mas con medio represor y posteriormente transferidas a medio represor. El tiempo de inducción/ represión se muestra en cada experimento.

En el caso de los experimentos de expresión constitutiva el promotor empleado fue P_{tef1} . En este caso las células fueron crecidas hasta $D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$ en medio YPD para posteriormente llevar a cabo cada análisis específico correspondiente a cada experimento.

3) METODOLOGÍA GENÉTICA.

3.1.- Construcciones de plásmidos recombinantes.

Los procedimientos de extracción de DNA plasmídico de *E. coli*, las digestiones de DNA con enzimas de restricción, el tratamiento con fosfatasa alcalina y los análisis electroforéticos fueron realizados como se describe por Ausubel y colaboradores (1997). Las encimas de restricción fueron compradas a la empresa New England Biolabs. Las ligaciones de DNA fueron realizadas usando la enzima T4 DNA ligasa de la empresa Roche. La purificación de fragmentos de DNA obtenidos de un gel de electroforesis TAE fue hecha siguiendo los pasos del kit QUIAGEN QUIAquick Gel Extraction. Las células de *E.coli* competentes fueron transformadas con cada plásmido purificado o mezclas de ligación por el método de choque térmico descrito por (Hanahan, 1983).

3.2- Reacciones de amplificación (PCR).

El mix y el programa de PCR empleado fueron ajustados según la DNA polimerasa empleada. El tiempo de elongación fue ajustado en base al tamaño del fragmento amplificado y la temperatura de anillamiento en base a los oligonucleótidos empleados. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador y las DNA polimerasas empleadas en este trabajo fueron: Taq (propia producción), Velocity (Roche).

Mix de reacción: 500 nM de cada oligonucleótido, 10 ng de DNA, 200 μ M de cada dNTP, 5 μ l de 10x Buffer y una unidad de DNA polimerasa para un volumen final de reacción de 50 μ l.

La DNA polimerasa Velocity (Roche) fue empleada para amplificaciones de alta fidelidad mientras que el resto de amplificaciones fueron llevadas a cabo usando la DNA polimerasa Taq (propia producción).

3.3.- Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico de *U. maydis* fue llevada a cabo según el protocolo descrito por (Hoffman and Winston, 1987) con pequeñas modificaciones. Primero las células fueron crecidas hasta la alcanzar fase exponencial ($D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$), 1.5 ml fue recogido por centrifugación durante 2 minutos a 14.000 rpm para posteriormente añadir *glass beads* (Sigma), 0.5 ml de tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS y 2% Triton) y 0.5 ml de fenol tamponado a pH=7 y sufrir ruptura mecánica empleando una Fastprep a una velocidad 5 durante 30 segundos. Después de la lisis, fueron recogidos 0.4 ml del sobrenadante y transferidos a nuevos tubos eppendorf a los cuales se les añadió 0.4 ml de isopropanol para precipitar el DNA. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y elimino el sobrenadante dejando secar los tubos al aire y resuspendiendo el DNA en 50 μ l de agua Mili-Q estéril incubando a 65°C durante 10 minutos en agitación.

3.4.- Transformación de *U. maydis*.

La transformación de *U. maydis* se llevo cabo según el protocolo descrito por (Schulz et al., 1990). En resumen, 50 ml de células fueron recogidas en fase exponencial (D.O_{600nm}= 0.6 – 0.8), lavadas con buffer SCS (20 mM citrato sódico pH 5.8, 1M sorbitol, agua Mili-Q), tratadas con Novocima328 (6 mg/ml), la cual fue resuspendida en buffer SCS y filtrada, durante 10 – 15 minutos a 25°C (hasta que las células adquirieron una morfología esférica). Tras este tratamiento, las células se mantuvieron siempre a 4°C y se hicieron dos lavados de las mismas con el buffer SCS y uno con el buffer STC (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1M CaCl₂, 1M sorbitol, agua Mili-Q) para finalmente ser resuspendidas en 0.5 ml de buffer STC, alícuoteadas en 50 µl y mantenidas a -80 °C.

La transformación se llevo a cabo siempre en hielo, primero incubando 50 µl de protoplastos junto con 1 µl de heparina y 5 µl de DNA linealizado durante 45 minutos. Después de este tiempo, se añadió 0.5 ml de STC que contiene 40% PEG 3350 y se mantuvieron durante 30 minutos mas en hielo. Finalmente, los protoplastos fueron sembrados sobre dos placas de agar de regeneración suplementadas con el antibiótico adecuado e incubadas a 28°C hasta que las colonias se formaron.

4) ANÁLISIS DE EXPRESION GENICA.

4.1.- Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR a Tiempo-Real.

Se partió de 6 ml de células crecidas hasta fase exponencial (D.O_{600nm}= 0.6 – 0.8) y recogidas por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm para posteriormente ser lavadas con 1ml de agua Mili-Q estéril y pasadas a tubos eppendorf de 2ml. Las células fueron recolectadas por centrifugación durante 1 minuto a 13.000 rpm y *glass beads* (Sigma) fueron añadidas, además de 400 µl una solución de fenol ácido y 400 µl de buffer de lisis de RNA (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 0.5 % SDS). A continuación se llevo a cabo una ruptura mecánica de las células en *Fastprep* a una velocidad de 4 durante 30 segundos y fueron incubadas durante 45 minutos a 65°C a una agitación de 500 rpm. Después de la lisis, los tubos fueron centrifugados a 13.000 rpm

durante 7 minutos y recogidos 400 µl del sobrenadante para ser mezclados de nuevo con 400 µl de fenol ácido y ser centrifugados durante 7 minutos a 13.000 rpm. A continuación, se recogieron 300 µl de la fase superior y fueron mezclados con 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugados otros 7 minutos a 13.000 rpm y finalmente se recolectaron 200 µl del sobrenadante.

Tras la extracción, el RNA total fue purificado usando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics Gmb) y su contenido fue cuantificado con un NanoValue Plus spectrophotometer (GE Healthcare).

Para la qRT-PCR, el cDNA fue sintetizado usando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) empleando 1 µg total de RNA por muestra.

La qRT-PCR fue realizada usando el mix SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) en un sistema CFX96 Real-Time (BioRad). La expresión del gen *tub1* de *U. madis* fue utilizado como referencia. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C, a continuación 40 ciclos: 10 segundos a 95°C/ 10 segundos a 60 °C/ 30 segundos a 72°C.

5) MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

5.1.- Extracción de proteínas.

Las células fueron crecidas hasta fase exponencial ($D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$) y 5 ml se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm para posteriormente ser resuspendidos en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. A continuación, fueron centrifugadas, el sobrenadante eliminado y el pellet resuspendido en 100 µl de TCA al 20%. *Glass beads* fueron añadidas para llevar a cabo una ruptura mecánica en *FastPrep*, 3 pulsos a velocidad 5 durante 15 segundos y 2 minutos en hielo entre cada pulso. Se recogió el lisado celular y las *glass beads* se lavaron con 200 µl de TCA al 5%. A continuación, el lisado total fue centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet con menor biomasa fue resuspendido en 100 µl de 2X Laemmli buffer (100mM Tris HCl pH 6.8, 4%

SDS, 200mM DTT, 20% glicerol y trazas de azul de bromofenol). Una vez resuspendido el pellet, 50 µl de Tris 2M fueron añadidos a cada muestra y hervidos durante 5 minutos a 100°C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 13200 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante recogido en nuevos tubos y congelados a -80°C.

5.2.- Western Blot.

Los extractos proteicos fueron separados en geles prehechos de poliacrilamida 4-20 % Mini-PROTEAN® TGX™ (BioRad) y corridos en un buffer de running Tris-HCl/Glicina/SDS (50mM/400mM/0.02%) a un amperaje constante de 20mA. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (Milipore) usando un sistema de transferencia en semi-seco Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Las condiciones de transferencia fueron: 0.2 mA durante 30 minutos en buffer de transferencia (48mM Tris-HCl pH 7.5, 39mM glicina, 0.0375% SDS, 20% etanol). El bloqueo de la membrana tras la transferencia se hizo durante 1 hora con leche al 10% resuspendida en PBS^T. El anticuerpo primario fue añadido a la concentración sugerida por cada fabricante de anticuerpo primario e incubado toda la noche a 4°C. En el caso de requerirse anticuerpo secundario este fue incubado durante 2 horas. Las proteínas fueron visualizadas usando un sustrato quimioluminescente. Dicha señal fue detectada usando películas fotográficas desarrolladas (Kodak M35, X-Omat Processor)

5.3.- Eliminación de anticuerpos en western blots (Stripping).

Los anticuerpos primarios y secundarios fueron eliminados de la membrana de western blot por “stripping”. La membrana fue incubada a temperatura ambiente en agitación durante 15 minutos con glicina 0.1 M. Después, fue lavada durante 3 veces con agua estéril e incubada otra vez durante 15 minutos con SDS 1%. A continuación, dicha membrana fue bloqueada de nuevo e incubada con los anticuerpos incubados de forma convencional.

6) MICROSCOPIA.

Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i con una cámara acoplada Hamamatsu Orca-ER gobernada por el software Metamorph (Universal Imagin, Downingtown, PA). Las imágenes fueron procesadas usando Adobe Photoshop CS o ImageJ software.

7) CONSTRUCCIÓN DE CEPAS EN *Ustilago maydis*.

Con el fin de generar estirpes mutantes de *U. maydis*, las construcciones descritas abajo fueron empleadas para transformar los protoplastos correspondientes. La secuenciación fue llevada a cabo por GATC Biotech y analizada con la herramienta bioinformática estándar Serial Cloner 2-6-1. La integración de las construcciones en su locus correspondiente por recombinación homologa fue chequeada por PCR y en el caso de deleciones génicas además por RT-PCR. Los oligonucleótidos usados para el diseño de las construcciones son detallados en la tabla 2 (ver al final de la sección).

Para la generación de los alelos mutantes abajo detallados se emplearon básicamente 3 sistemas:

7.1.-Generación de alelos mutantes usando el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004).

Esta estrategia se basa en la amplificación vía PCR de 2 fragmentos 5' y 3' (1Kb aproximadamente) de homología del locus de interés flanqueados ambos con sitios de restricción *SfiI*. Dichos fragmentos se obtienen vía PCR (Velocity) usando DNA genómico de FB1 y la pareja de oligonucleótidos adecuada. Posteriormente son ligados mediante una ligación tripartita a los vectores *SfiI* correspondientes. La ligación es subclonada en PJET 1.2/blunt (Thermo Scientific) y transformada en células competentes de *E.coli*. Finalmente, el plásmido obtenido es linealizado vía *PmeI* y transformado en protoplastos de *U.maydis* obteniéndose las estirpes mutantes vía recombinación homologa.

7.2.- Generación de alelos mutantes usando el sistema Golden Gate (Terfruchte et al., 2014).

Esta estrategia usa la enzima *BsaI* ó *SapI* para clonar y generar los plásmidos que contienen un modulo de reemplazamiento génico. Una descripción breve del sistema es la siguiente, 5 componentes son mezclados juntos en una única reacción: la T4 DNA ligasa (Roche), el vector que contiene el modulo de reemplazamiento génico con la resistencia elegida (pStor), el vector de destino que alberga el gen *lacZ* que permite la selección de colonias azules ó blancas (pDest), 2 regiones *homologas de 1Kb al locus a mutar flanqueadas son el sitio de restricción para BsaI/SapI*. El plásmido obtenido se puede linealizar con la enzima de restricción *PmeI* y ser transformado en *U. maydis*.

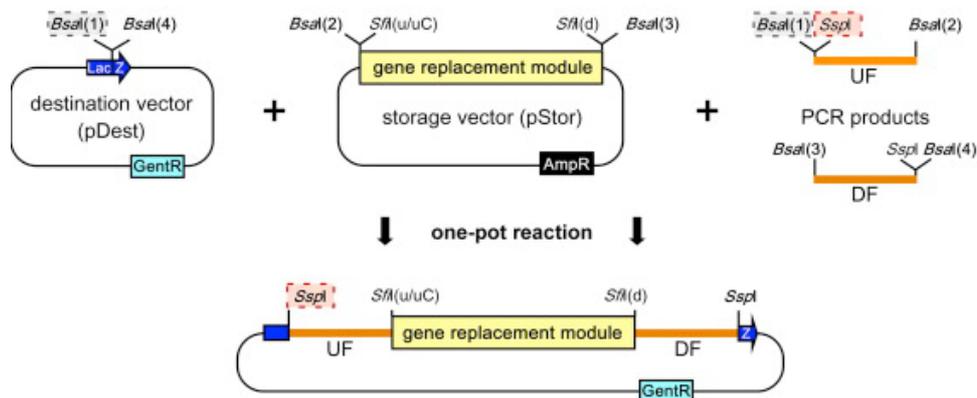


Fig1. Esquema representativo de la estrategia de reemplazamiento génico empleando el sistema Golden Gate. Adaptado de (Terfruchte et al., 2014). La generación del vector para llevar a cabo el reemplazamiento génico consiste en la mezcla de 4 componentes en una misma reacción que incluye DNA ligasa y la encima *BsaI*. Dos fragmentos de homología de aproximadamente 1Kb obtenidos por PCR y flanqueados por sitios *BsaI* son mezclados junto con el vector que contiene el modulo de reemplazamiento con la resistencia a antibiótico elegida (pStore) y el vector de destino que permite la selección de colonias blancas/azules (*lacZ*) (pDest). La escisión del fragmento de reemplazamiento lineal se obtiene vía restricción con *SspI*.

La obtención de los fragmentos de 1Kb homólogos al locus a mutar se llevo a cabo por PCR usando la DNA polimerasa de alta fidelidad Velocity (Roche). La reacción estándar de Golden Gate se llevo a cabo en un único paso de un volumen final de 15 μ l donde se mezclaron: 40 ng de cada fragmento de PCR

homologo flanqueado por sitios *BsaI/SapI* purificados, 75 ng pStor, 75 ng pDest, 1x Buffer T4 DNA ligasa, 0,75 µl T4 DNA ligasa (Roche, 0.75 U), 0.5 µl *BsaI*-HF (NEB; 10U). La reacción se hizo en una máquina de PCR siguiendo el siguiente programa: [37°C 2 min, 16°C 5 min] 50 ciclos, 37 °C 5 min, 50 °C 5 min, 80°C 5 min.

7.3.-Generación de alelos mutantes usando el sistema Cre-lox (No publicado).

Esta estrategia es empleada para obtener mutantes de delección para genes esenciales basándose en la capacidad de la recombinasa Cre1 de reconocer las secuencias específicas de DNA, denominadas sitios *lox*, y mediar la recombinación entre dichos sitios.

Para la generación de los alelos mutantes mediante este sistema basta con flanquear los extremos 5´y 3´ del gen de interés con la secuencia de los sitios *lox* a fin de que sean reconocidos por la enzima recombinasa Cre1, cuya expresión esta controlada bajo un promotor inducible por arabinosa (P_{crg1}) y la droga 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). De este modo en presencia de arabinosa y 4-OHT se promueve la escisión del alelo y se generan mutantes de delección de una forma controlada (normalmente es usada para genes esenciales).

Esta estrategia se basa en 3 pasos:

1º) Para flanquear el extremo 5´ con el sitio *lox* se llevo a cabo una primera transformación (en esquema marcado con negro) con un cassette el cual consta: gen de resistencia a antibiótico de selección, el promotor de expresión constitutiva (P_{Teff1}) seguido del sitio *lox1*, por lo tanto se produce un cambio del promotor nativo por uno de expresión constitutiva.

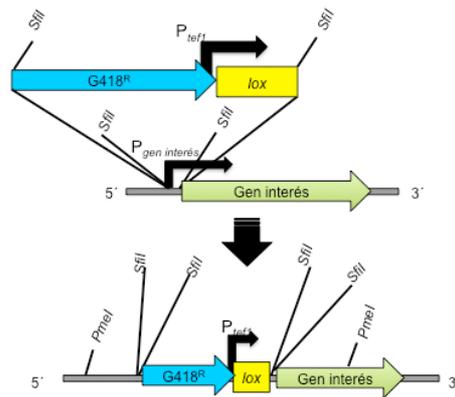


Fig. 2. Ilustración representativa para flanquear el extremo 5' del gen de interés con el sitio *lox* para llevar a cabo la deleción del gen vía sistema Cre-*lox*.

2º) Para flanquear el extremo 3' con el sitio *lox2* se llevo a cabo una segunda transformación (en esquema marcado en azul, el negro corresponde al paso anterior) con un cassette que consta de: sitio *lox*, una GFP-NLS que nos permite seguir que células son mutantes de deleción para el gen de interés por microscopía al acoplarse la GFP-NLS al promotor de expresión constitutiva cuando el gen se ha escindido y el antibiótico de resistencia para la selección de los transformantes.

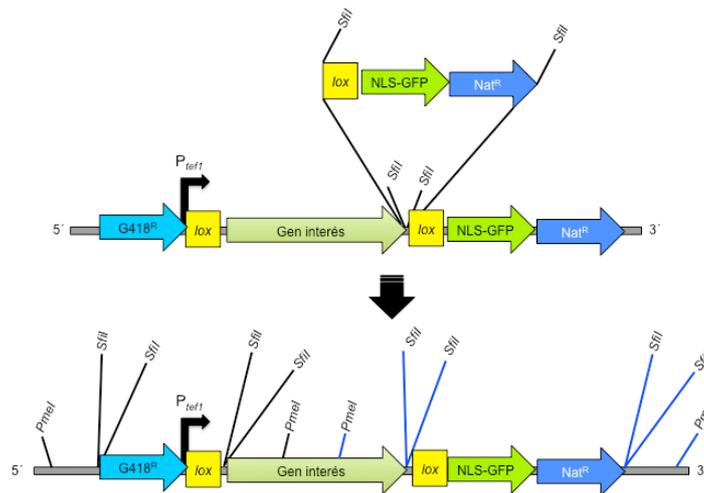


Fig. 3. Ilustración representativa para flanquear el extremo 3' del gen de interés con el sitio *lox2* para llevar a cabo la deleción del gen vía sistema Cre-*lox*.

3°) Por último, se requiere una tercera transformación para la integración ectópica de la enzima recombinasa Cre1 en el locus *cbx*. La expresión de este gen esta controlada bajo el promotor de expresión inducible por arabinosa (P_{Crg1}) y 4-hidroxitamosifeno (4-OHT) ($1 \mu\text{M}$).

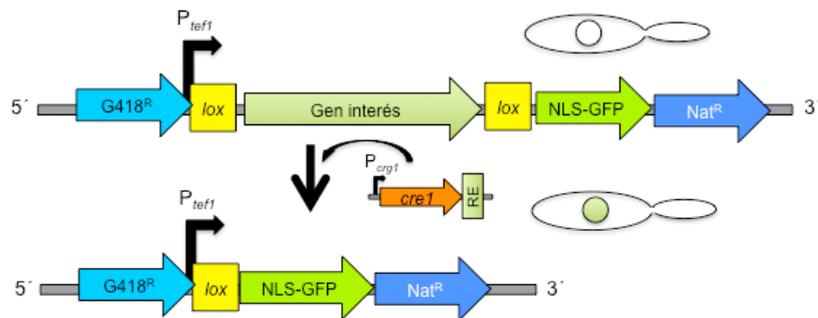


Fig. 4. Esquema representativo de la ablación genética de un gen de interés llevada a cabo con el sistema *Cre-lox* en presencia de arabinosa y 4-hidroxitamosifeno (4-OHT). La escisión del gen deleciónado puede ser seguida por microscopía siendo las células mutantes aquellas que portan señal nuclear GFP.

➤ Deleciones:

La deleción de los alelos abajo representados fue llevada a cabo por el **sistema *SfiI*** (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004).

Brevemente, un par de fragmentos de 1Kb (5' y 3') que flanquean a la ORF fueron amplificados usando los oligonucleótidos correspondientes y DNA genómico de FB1. Ambos están terminados en sitios *SfiI* compatibles y son ligados a los **vectores *SfiI*** que contienen la resistencia a antibiótico deseada reemplazando la ORF por una resistencia a antibiótico.

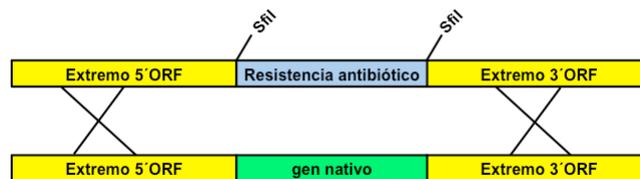
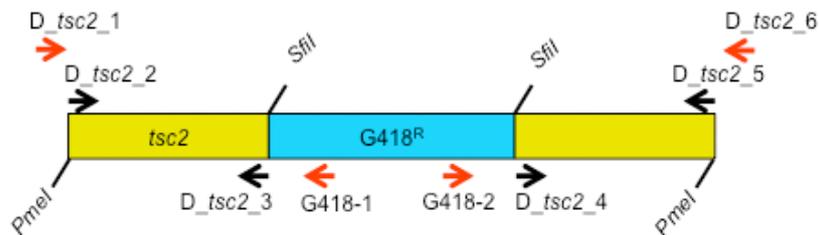


Fig. 5. Esquema representativo de deleción genética mediante el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004)

Las parejas de oligonucleótidos usadas para la realización de las construcciones aparecen en negro en las figuras mientras que en rojo se representan las parejas empujadas para el chequeo de la correcta inserción.

- **tsc2Δ:**



- **atg1Δ:**

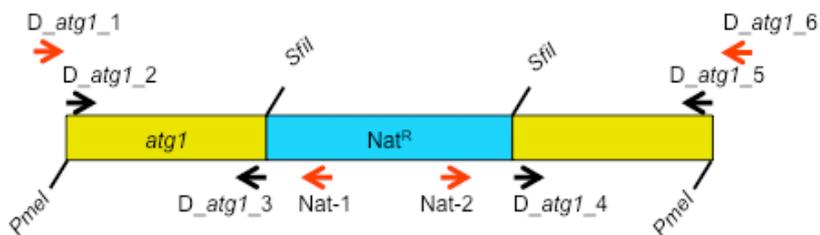
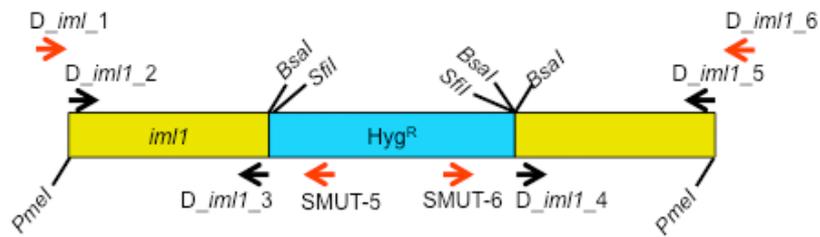


Fig. 5. Esquema representativo de la delección de diversos genes mediante el sistema *Sfi* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004). En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

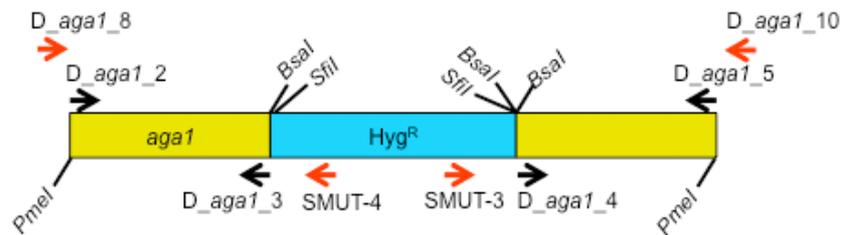
Las delecciones de los genes abajo descritos se realizó con el sistema **Golden Gate** (Terfruchte et al., 2014).

Brevemente, un par de fragmentos de 1Kb (5'y 3') que flanquean a la ORF fueron amplificados usando los oligonucleótidos correspondientes y DNA genómico de FB1. Ambos están terminados en sitios *BsaI* o *SapI*. Las resistencias a los distintos antibióticos pueden ser intercambiadas vía *SfiI* usando los vectores del sistema *Sfi*.

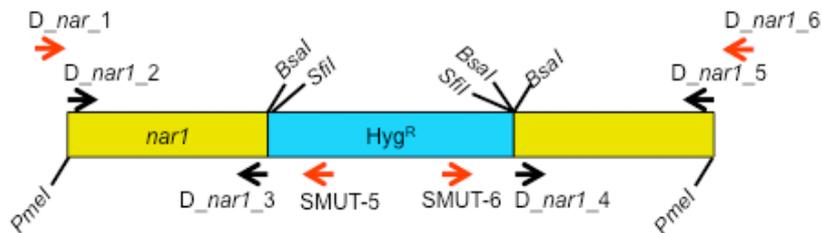
- ***Iml1Δ***:



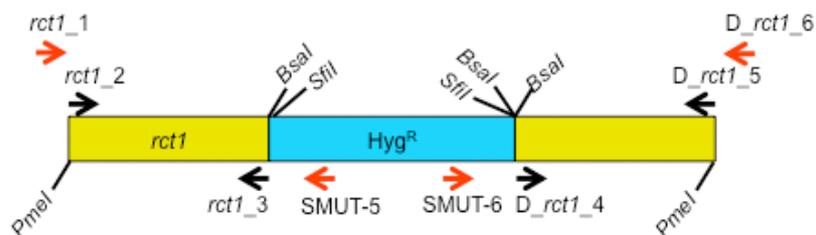
- ***aga1Δ***:



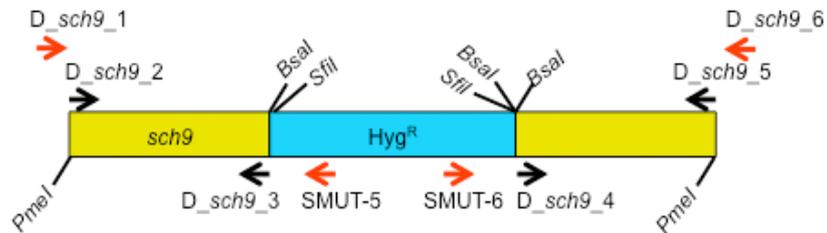
- ***nar1Δ***:



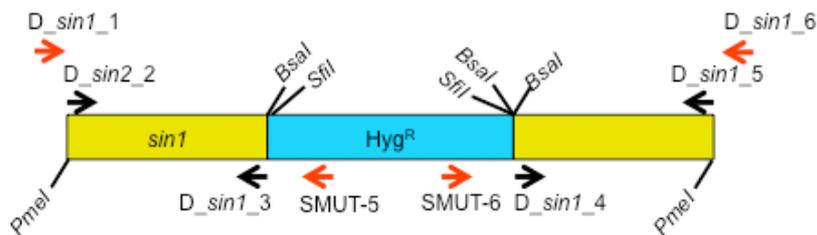
- ***rct1Δ***:



- ***sch9Δ***:



- ***sin1Δ***:



- ***dik6Δ***:

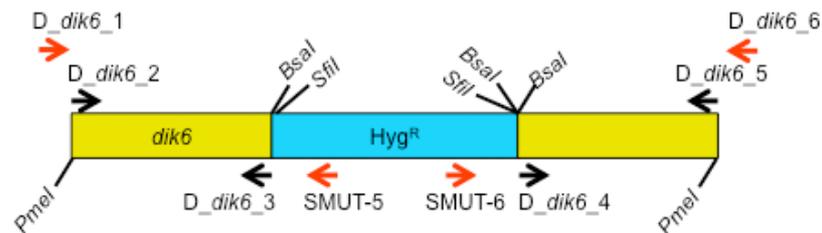


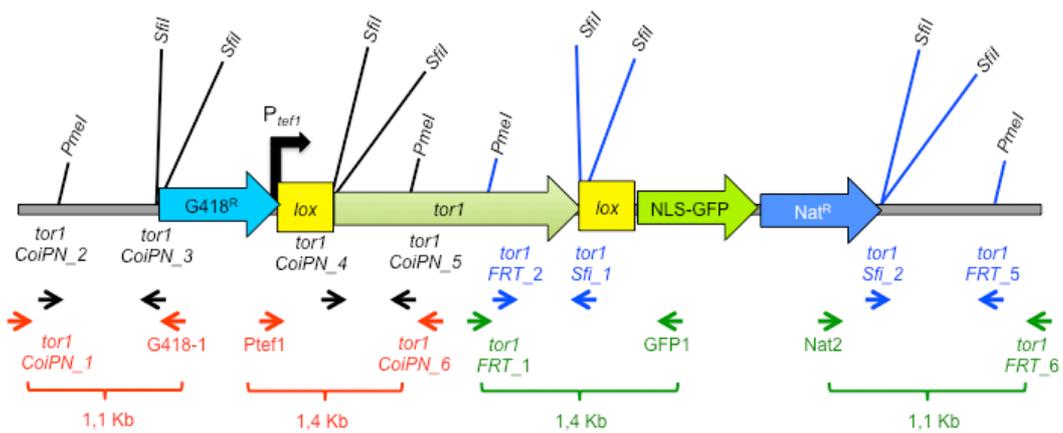
Fig. 6. Esquema representativo de la delección de diversos genes mediante el sistema Golden Gate (Terfruchte et al., 2014). En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

Las delecciones de los alelos abajo representados fue llevada a cabo mediante el **sistema Cre-lox**.

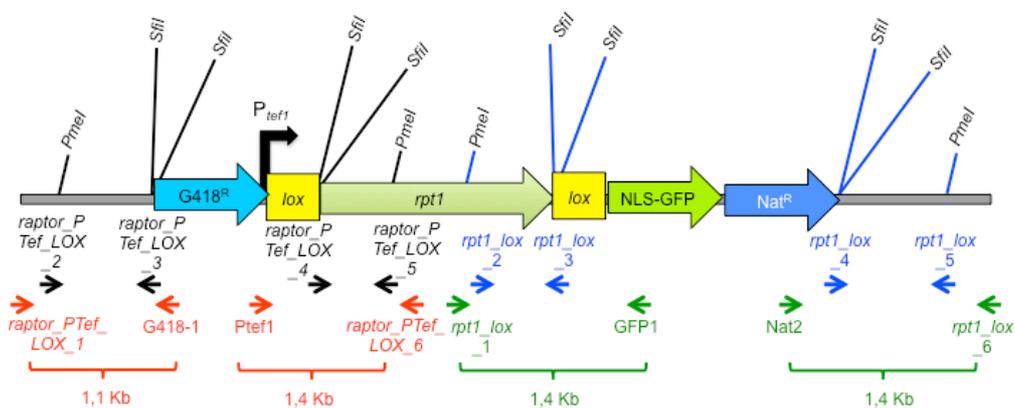
Brevemente, los alelos a deletionar fueron flanqueados en sus extremos 5' y 3' con la secuencia *lox* la cual es reconocida por la enzima recombinasa Cre1, cuya expresión esta controlada bajo un promotor inducible por arabinosa (P_{crg1}) y la droga 4-hydroxitamosifeno (4-OHT) bien en un plásmido autoreplicativo (pKH7) ó integrada ectópicamente en el locus *cbx*. Los transformante obtenidos fueron chequeados por microscopía.

(Las parejas de oligonucleotidos representadas en negro se emplearon para flanquear el extremo 5', en azul para flanquear el extremo 3', en rojo y verde se representan las parejas empeadas para el chequeo de la correcta inserción).

- ***tor^{lox}***:



- ***rpt^{lox}***:



- ***adr1^{lox}***:

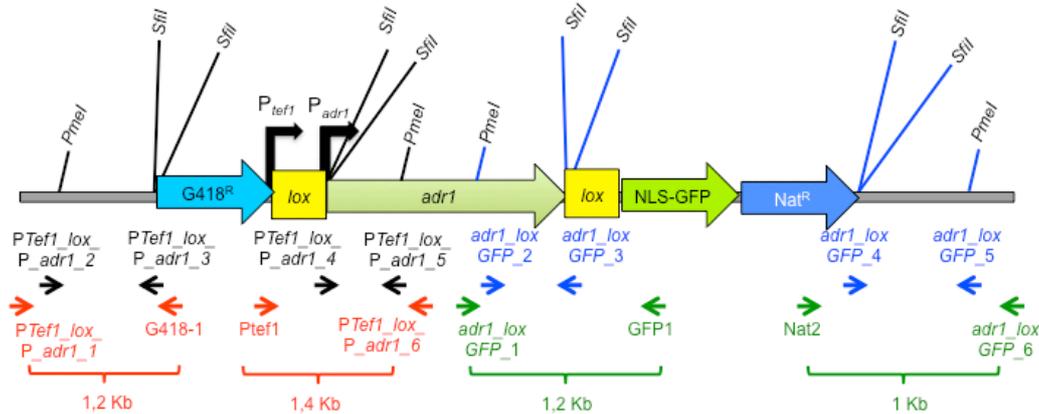


Fig. 7. Esquema representativo de la delección de diversos genes mediante el Cre-lox. En negro y azul se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo y verde se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

➤ **Fusiones GFP/ HA/ Cherry.**

- **Construcción del alelo *dik6*-GFP**

Se llevo a cabo usando el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004). De una forma rápida y simple, se amplificó 1 Kb del fragmento C terminal de la ORF de *dik6* excluyendo el codón de parada con la pareja de oligonucleótidos *dik6_2/ dik6_3*, y 1Kb aguas abajo tras el codón de stop con la pareja de oligonucleótidos *dik6_4/ dik6_5*. Ambos fragmentos fueron digeridos con *SfiI* y ligados al fragmento GFP-Nat (2,4 Kb) aislado como *SfiI* del plásmido pMF5-1n. El producto de ligación fue clonado en el vector PJET1.2/blunt (Thermo Scientific). El plásmido se linealizó con *PmeI* y se transformaron protoplastos de *U.maydis*. Los transformantes obtenidos se chequearon por PCR usando las pareja de oligonucleótidos marcadas en rojo en el esquema abajo representado.

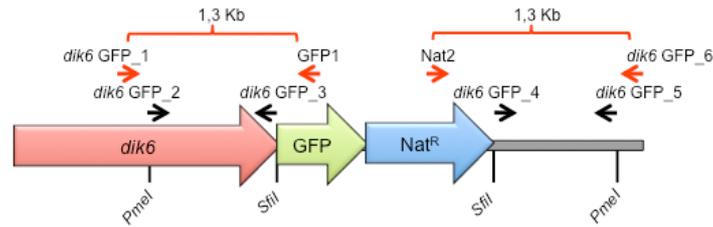


Fig. 8. Esquema representativo de la construcción del alelo *dik6*-GFP. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

▪ Construcción del alelo *aga1*-3HA

Se llevo a cabo usando el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004). De una forma rápida y simple, se amplificó 1 Kb del fragmento C terminal de la ORF de *aga1* excluyendo el codón de parada con la pareja de oligonucleótidos *aga1_2/ aga1_9*, y 1Kb aguas abajo tras el codón de stop con la pareja de oligonucleótidos *aga1_6/ aga1_7*. Ambos fragmentos fueron digeridos con *SfiI* y ligados al fragmento 3HA G418 (2,4 Kb) aislado como *SfiI* del plásmido pMF5-9g. El producto de ligación fue clonado en el vector PJET1.2/blunt (Thermo Scientific). El plásmido se linealizó con *PacI* y se transformaron protoplastos de *U.maydis*. Los transformantes obtenidos se chequearon por PCR usando las pareja de oligonucleótidos marcadas en rojo en el esquema abajo representado.

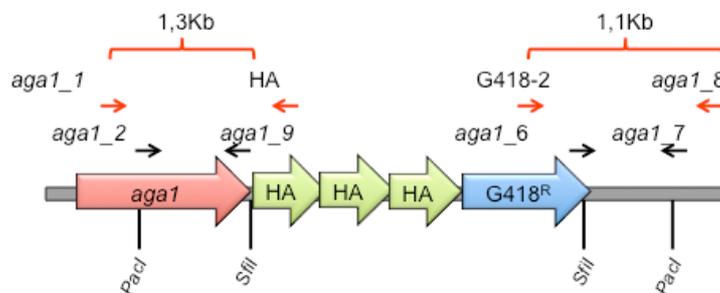


Fig. 9. Esquema representativo de la construcción del alelo *aga1*-3HA. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las

parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

▪ Construcción del alelo *ubc1-3HA*

Se llevo a cabo usando el sistema Golden gate (Terfruchte et al., 2014). De una forma rápida y sencilla, se amplificó 1 Kb del fragmento C terminal de la ORF de *ubc1* excluyendo el codón de parada con la pareja de oligonucleótidos *ubc1-GFP_2/ ubc1-GFP_3*, y 1Kb aguas abajo tras el codón de stop con la pareja de oligonucleótidos *ubc1-GFP_4/ ubc1-GFP_5*. Tras ser purificados ambos fragmentos fueron mezclados y se realizó una reacción estándar de Golden Gate usando como vector Storage el pGFP. El plásmido obtenido fue digerido con *SfiI* obteniéndose un fragmento de 4,4 Kb el cual fue ligado al fragmento de 3 kb procedente de la previa digestión vía *SfiI* del plásmido pMF5-9h. El plásmido obtenido finalmente fue linealizado vía *PmeI* y transformado en protoplastos de *U.maydis*. Los transformantes obtenidos se chequearon por PCR usando las pareja de oligonucleótidos marcadas en rojo en el esquema abajo representado.

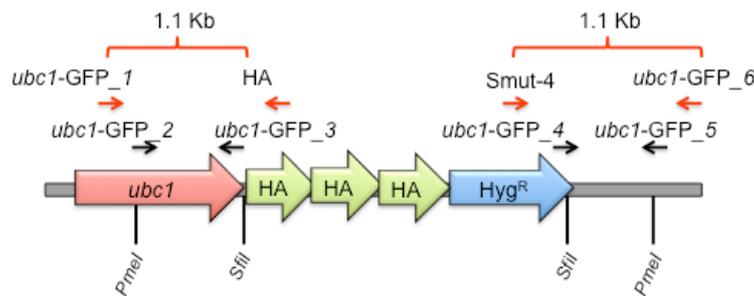


Fig. 10. Esquema representativo de la construcción del alelo *ubc1-3HA*. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

▪ Construcción del alelo GFP-*rheb1*

Para la construcción del alelo GFP-*rheb1* se empleó la técnica del sistema Cre-lox con alguna modificación. Rápidamente y de una forma sencilla, se amplificaron desde DNA genómico 1 Kb aguas arriba desde el codón de

iniciación usando la pareja de oligonucleótidos GFP-*rheb1*-2 / GFP-*rheb1*-3 y 1 Kb aguas abajo desde el codón de inicio (incluyéndose dicho codón) usando la pareja de oligonucleótidos GFP-*rheb1*-4/ GFP-*rheb1*-5. Los fragmentos de PCR fueron digeridos vía *Sfi*I y fueron ligados al fragmento LOX_Hyg-P_{tef1}LOX_GFP obtenido de la digestión vía *Sfi*I del plásmido pNt_GFP_LOX_hyg (4,4 Kb). El plásmido resultando fue linealizado vía *Pme*I y transformado sobre protoplastos de *U.maydis*.

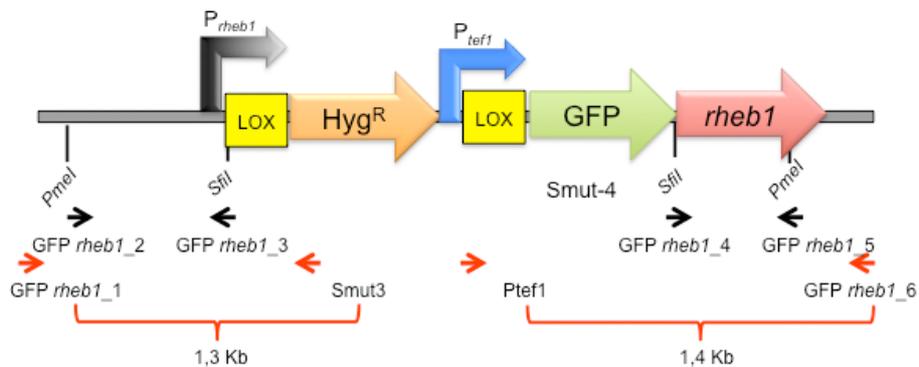


Fig. 11. Esquema representativo de la construcción del marcateo en el extremo N-terminal con el epítipo verde fluorescente (GFP) de la proteína Rheb1 empleando el sistema Cre-*lox*. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

Las estirpes de *U.maydis* que fueron positivas fueron transformadas de nuevo con el plásmido autoreplicativo que contiene la enzima Cre1 (pKh7) controlada bajo el promotor inducible por arabinosa (P_{crg1}). De tal modo que en presencia de arabinosa el fragmento Hyg_P_{tef1}_LOX fue expulsado, quedando marcada la proteína en su extremo N-terminal bajo el control de su propio promotor.

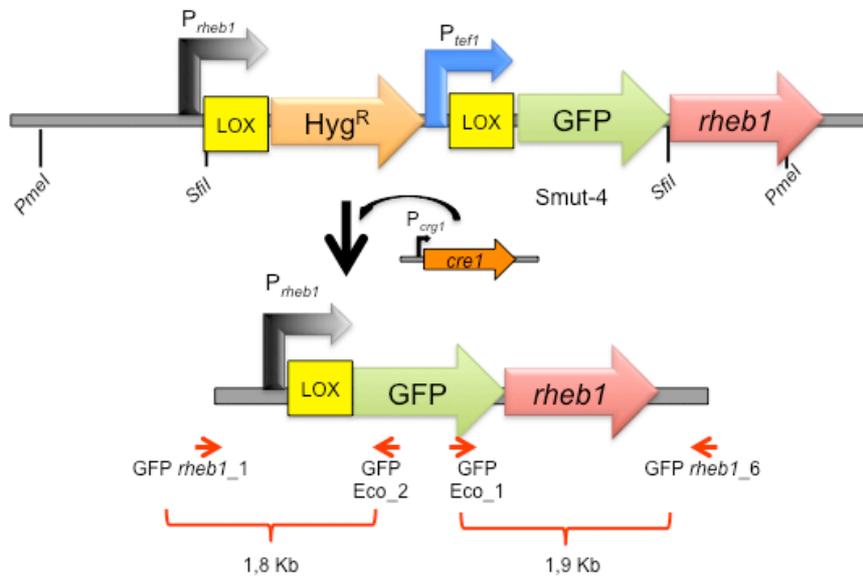


Fig. 12. Esquema representativo para construcción y comprobación del alelo GFP-*rheb1*. En rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

Por ultimo, a las estirpes positivas se les dejo perder el plásmido autoreplicativo haciendo varios pases en medio de cultivo rico (YPD) sin antibiótico de resistencia.

▪ Construcción del alelo GFP-*atg8*

Para construir el alelo GFP-*atg8*, se amplificó 1 Kb aguas arriba desde el codón de inicio de la ORF (excluyendo dicho codón) con la pareja de oligonucleótidos *atg8_2/ atg8_3* y 1Kb desde el inicio de la ORF con la pareja de oligonucleótidos *atg8_4/ atg8_5*. Generándose 2 fragmentos flanqueados por sitios *SfiI* y *PmeI* que fueron digeridos con *SfiI* y ligados al fragmento CBX-*P_tef1*GFP el cual fue aislado a partir de la digestión vía *SfiI* del plásmido p*P_tef1*GFP-Cbx.

El producto de la ligación fue clonado en PJET1.2/blunt (Thermo Scientific) y así obtenido el plásmido pCBX-*P_tef1*GFP-*atg8*. El plásmido fue digerido con *PmeI* e introducido por recombinação homóloga en protoplastos de *U. maydis*. Los transformantes fueron analizados por PCR usando la pareja de

oligonucleótidos *atg8_1*/ CBX1 para el borde 5' (fragmento de 1,2 Kb) y la pareja de oligonucleótidos *atg8_6*/ pTef1 para el borde 3' (fragmento de 2 Kb).

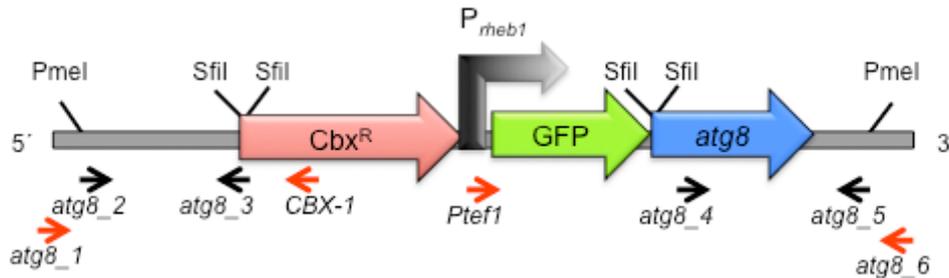


Fig. 13. Esquema representativo para construcción y comprobación del alelo GFP-*atg8*. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

▪ Construcción del alelo P_{tef1} Maf1-3HA

La construcción del alelo P_{tef1} *maf1*-3HA se llevo a cabo en dos pasos: 1) se marco la proteína Maf1 con el epítipo 3HA en su el extremo C terminal usando el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004) y 2) se intercambio su propio promotor por un promotor de expresión constitutiva (P_{tef1}).

- 1) Se amplifico 1 Kb del fragmento C terminal de la ORF de *maf1* excluyendo el codón de parada con la pareja de oligonucleótidos *maf1_2*/ *maf1_3*, y 1Kb aguas abajo tras el codón de stop con la pareja de oligonucleótidos *maf1_4*/ *maf1_5*. Ambos fragmentos fueron digeridos con *SfiI* y ligados al fragmento 3HA-hyg aislado como *SfiI* del plásmido pMF5-9h. El producto de ligación fue clonado en el vector PJET1.2/blunt (Thermo Scientific) y el plásmido obtenido corresponde al alelo *maf1*-3HA hyg.

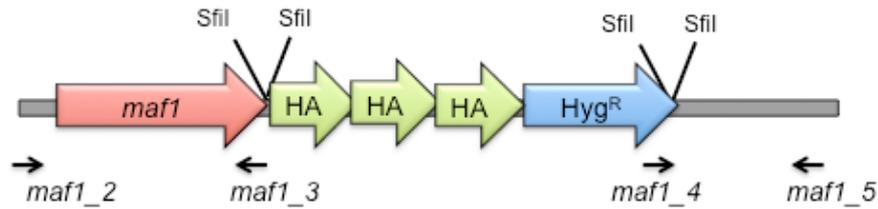


Fig. 14. Esquema representativo para construcción del alelo *maf1*-3HA. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la amplificación de los fragmentos flanqueantes de 1Kb 5' y 3' necesarios para llevar a cabo la construcción empleando el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004).

- 2) Se amplificó toda la ORF de *maf1* junto con el epítopo fusionado 3HA *hyg* usando la pareja de oligonucleótidos *maf1_ectópico/ Smut-3* originándose un fragmento de 1,7 Kb flanqueado por sitios *NdeI* y *AflII*. El fragmento fue ligado al fragmento de 4,6 Kb del vector PCU3 previamente digerido con *NdeI/AflII* generándose el plásmido que porta el alelo P_{tef1} *maf1*-3HA CBX. Este plásmido fue linealizado con *SspI* y transformado en *U.maydis*. Los transformantes fueron chequeados por PCR usando la pareja de oligonucleótidos *maf1_RT/ CBX3* (0,95 Kb).

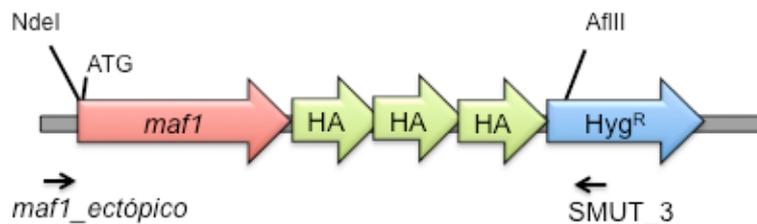


Fig. 15. Esquema representativo para construcción e integración ectópica del alelo *maf1*-3HA. En negro se indica la pareja de oligonucleótidos empleada para la amplificación de la ORF de *maf1* completa junto con el marcaje 3-HA.

▪ **Construcción del alelo P_{tef1} Cherry Cpy**

Para construir el alelo P_{tef1} Cherry *cpy*, se amplificó todo el gen de la carboxipeptidasa Y (*cpy*) con la pareja de oligonucleótidos 123_*cpy*_1/123_*cpy*_2 generándose un fragmento de PCR de 1.7 Kb flanqueado por los sitios de restricción *NcoI* y *XmaI*. Este fragmento fue ligado al fragmento de 6,2 Kb del vector p123-Cherry previamente digerido con *NcoI/XmaI* generándose el plásmido que porta el alelo P_{tef1} Cherry *cpy cbx*. Este plásmido fue linealizado con *SspI* y transformado en *U.maydis*. Los transformantes fueron chequeados por PCR usando la pareja de oligonucleótidos 123_*cpy*_Check_1 / *ptef1* (1,4 Kb) y 123_*cpy*_Check_2 / Cherry-1 (0,7 Kb).

➤ sustitución del promotor nativo por los promotores de expresión condicional P_{nar1} y expresión constitutiva P_{tef1} .

• Construcción para la expresión de alelos de forma condicional

La sustitución de los promotores nativos de los alelos abajo descritos fue llevada a cabo por el sistema *SfiI* (Brachmann et al., 2004; Kamper, 2004).

Rápidamente, para la generación de los plásmidos correspondientes abajo representados un par de fragmentos de 1Kb fueron amplificados desde DNA genómico de FB1 usando las parejas de oligonucleótidos adecuadas (marcados en negro en los esquemas). Ambos fragmentos están flanqueados por sitios *SfiI* compatibles con los sitios *SfiI* de los vectores que portan el promotor y resistencia deseada. Dichos productos de PCR y el vector fueron digeridos vía *SfiI* y posteriormente ligados. El producto de la ligación fue clonado en PJET1.2/blunt (Thermo Scientific) y el plásmido obtenido linealizado con *PacI* para finalmente ser transformado en *U.maydis*. Los transformantes obtenidos fueron chequeados por PCR con las parejas de oligonucleótidos adecuadas (marcados en rojo).

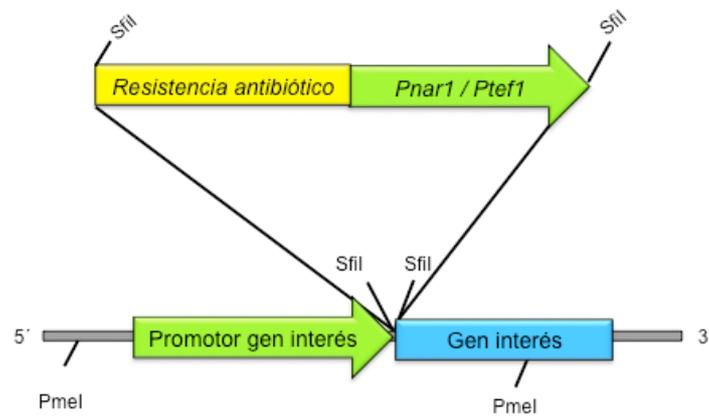
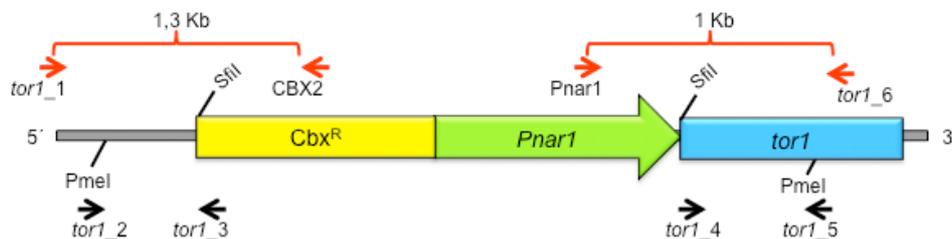
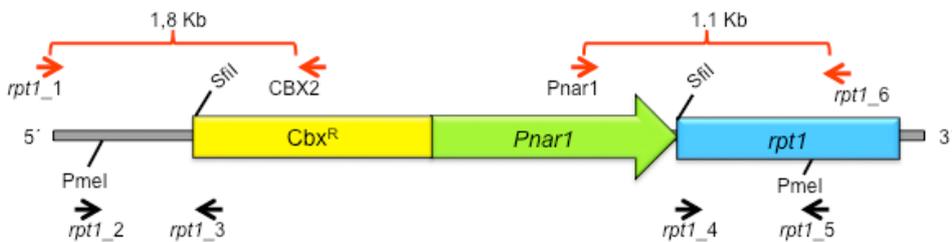


Fig. 16. Esquema representativo de la sustitución del promotor nativo por promotores de expresión condicional.

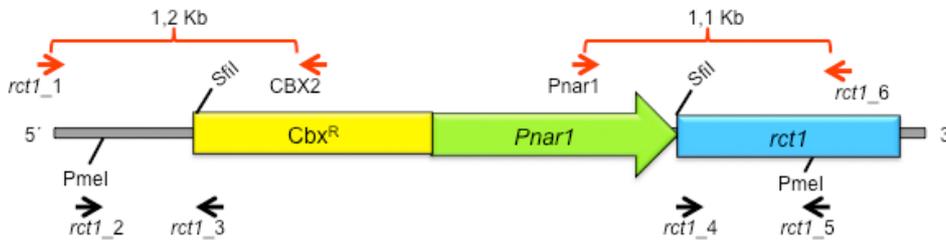
- ***tor1^{nar1}*:**



- ***rpt1^{nar1}* (*raptor1*):**



- ***rct^{nar1}* (*rictor1*):**



- ***sin1^{nar1}*:**

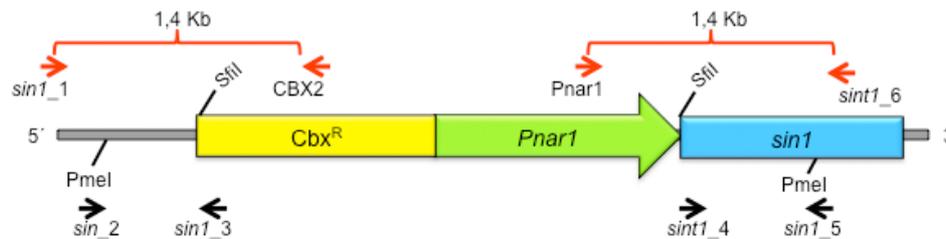


Fig. 17. Esquema representativo de la sustitución del promotor nativo por el promotor inducible por nitrato P_{nar1} en diversos genes. En negro se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la construcción mientras que en rojo se indican las parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación de la integración correcta en el genoma.

- **Construcción de los alelos $P_{dik6} ubc1$ y $P_{dik6} adr1$**

Para la obtención de estos alelos y su posterior integración ectópica en *U.maydis* se construyeron los plásmidos de la forma continuación descrita. Se amplificaron las ORF completas para los genes *ubc1* y *adr1* flanqueados por sitios de restricción *NdeI*/*AflII* usando las parejas de oligonucleótidos siguientes: *adr1F*/*adr1R* (1,4 Kb) y *ubc1F*/*ubc1R* (1,8 Kb). Los productos de amplificación por PCR fueron digeridos vía *NdeI* y *AflII* al igual que el plásmido $pP_{dik6}cre1-CBX$ (fragmento de 5,5 Kb) y posteriormente fueron ligados generándose los plásmidos $pP_{dik6}Ubc1-CBX$ y $pP_{dik6}Adr1-CBX$. Estos plásmidos fueron digeridos con *SspI* y transformados en *U.maydis*. Los transformantes

obtenidos se chequearon por PCR usando la pareja de oligonucleótidos dik6/CBX3 generando un fragmento de 1, 5 Kb.

Construcción de los alelos $P_{nar1} rheb1$ y $P_{nar1} rheb1^{K127R}$

La obtención del alelo $P_{nar1} rheb1$ y su posterior integración ectópica en *U.maydis* fue llevada a cabo de la siguiente manera. Se amplificó la ORF completa de *rheb1* a partir de DNA genómico de FB1 usando la pareja de oligonucleótidos *rheb1-NdeI* / *rheb1-EcoRI* (fragmento de 0,68 Kb) quedando así flanqueada por sitios de restricción *NdeI*/ *EcoRI*. El producto de amplificación por PCR fue digerido vía *NdeI* y *EcoRI* además del plásmido pRU2 (fragmento de 5,5 Kb). Posteriormente, ambos fragmentos fueron ligados generándose el plásmido p $P_{nar1} Rheb1$ -CBX. Este fue linealizado con *PstI* y transformado en *U.maydis*. Los transformantes obtenidos se chequearon por PCR usando la pareja de oligonucleótidos *pnar1/ rheb1* Q71L check generando un fragmento de 0,8 Kb.

Para el caso del alelo $P_{nar1} rheb1^{K127R}$ el plásmido fue construido de la forma que a continuación es detallada. Se amplificó la ORF completa del gen *rheb1* en dos pasos para introducir la mutación K127R que otorga la hiperactivación de la proteína Rheb1 en *S. pombe* (Urano et al., 2005) a partir de DNA genómico de *U. maydis* usando la parejas de oligonucleótidos siguientes *rheb1-NdeI* / *rheb1KR-2* (fragmento de 0.5 Kb) y *rheb1-EcoRI* / *rheb1KR-1* (fragmento de 0.2 Kb). Ambos productos de PCR fueron purificados y anillados generándose la reconstrucción total de la ORF de *rheb1* con la mutación insertada. El producto final se subclonó en PJET 1.2/blunt y el plásmido obtenido fue chequeado por secuenciación. Finalmente, se integro en el vector pRU2 vía *NdeI* / *EcoRI*. El plásmido final fue digerido con *PstI* y transformado en *U.maydis*. Los transformantes obtenidos se chequearon por PCR usando la pareja de oligonucleótidos *pnar1/ rheb1* Q71L check generando un fragmento de 0,8 Kb.

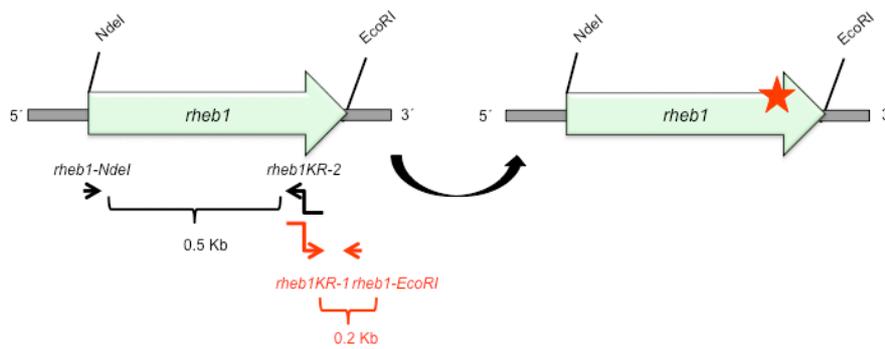


Fig. 18. Esquema representativo para la introducción de la mutación puntual K127R en el gen *rheb1*. Las puntas de flechas indican las parejas de oligonucleótidos de los extremos mientras que las flechas indican las parejas de oligonucleótidos que portan la mutación puntual K127R.

8) Tablas de estirpes y oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
AB33	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1$	(Brachmann et al., 2001)
AB34	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bw2$	(Brachmann et al., 2001)
AUM 1	$a1b1 rpt1^{nar1}$	Este trabajo
AUM 101	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tsc2\Delta$	Este trabajo
AUM 103	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tor1^{lox} P_{crg1}: cre1-RE$	Este trabajo
AUM 104	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 rpt1^{lox} P_{crg1}: cre1-RE$	Este trabajo
AUM 110	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 sch9\Delta aga1\Delta$	Este trabajo
AUM 114	$a1b1 sin1\Delta aga1-3HA$	Este trabajo
AUM 117	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tsc2\Delta sch9\Delta$	Este trabajo
AUM 118	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 P_{dik6}: adr1$	Este trabajo
AUM 120	$a1b1 rpt1^{lox} P_{crg1}: cre1-RE aga1-3HA$	Este trabajo
AUM 123	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tsc2\Delta aga1\Delta$	Este trabajo
AUM 128	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tsc2\Delta aga1\Delta sch9\Delta$	Este trabajo
AUM 135	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 ubc1 3HA$	Este trabajo
AUM 138	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bw2 ubc1 3HA$	Este trabajo
AUM 150	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 P_{nar1}: rheb1$	Este trabajo
AUM 151	$a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}: bE1 tsc2\Delta GFP: atg8^{tef1}$	Este trabajo

Materiales y métodos

AUM 158	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tsc2Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 16	<i>a1b1 sin1^{nar1}</i>	Este trabajo
AUM 160	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 adr1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 165	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 atg1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 166	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tsc2Δ adr1^{Lox} P_{nar1}: cre1RE</i>	Este trabajo
AUM 168	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:rheb1^{k127R}</i>	Este trabajo
AUM 170	<i>a1b1 GFP:atg8^{tef1}</i>	
AUM 171	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 172	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 aga1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 174	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 179	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 ubc1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 180	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 sch9Δ aga1Δ</i>	Este trabajo
AUM 181	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 adr1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 182	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tsc2Δ P_{dik6}:Ubc1</i>	Este trabajo
AUM 183	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tsc2Δ aga1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 184	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{dik6}:adr1 GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 186	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:rheb1^{k127R} GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 187	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{Tef1}:cherry- cpy</i>	Este trabajo

Materiales y métodos

AUM 188	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 P_{Tef1}:cherry- cpy</i>	Este trabajo
AUM 189	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{Tef1}:cherry- cpy GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 190	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 sch9Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 191	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 P_{Tef1}:cherry- cpy GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 193	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 nar1Δ</i>	Este trabajo
AUM 194	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ P_{tef1}:maf1-3HA</i>	
AUM 195	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ</i>	Este trabajo
AUM 196	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ aga1Δ</i>	Este trabajo
AUM 197	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 dik6Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 199	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ dik6Δ</i>	Este trabajo
AUM 2	<i>a1b1 tor1^{nar1}</i>	Este trabajo
AUM 202	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ atg1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 203	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ aga1Δ GFP:atg8^{tef1}</i>	Este trabajo
AUM 208	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 tsc2Δ P_{tef1}:maf1-3HA</i>	
AUM 210	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{tef1}:maf1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 211	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 nar1Δ P_{tef1}:maf1-3HA</i>	
AUM 211	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 dik6Δ P_{tef1}:maf1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 212	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tsc2Δ ubc1 3HA</i>	Este trabajo

<i>GFP-adr1</i>		
AUM 213	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ aga1 3HA</i>	Este trabajo
AUM 214	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 nar1Δ aga1 3HA</i>	Este trabajo
AUM 215	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 P_{nar1}:rheb1</i>	Este trabajo
AUM 216	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 nar1Δ iml1Δ</i>	Este trabajo
AUM 26	<i>a1b1 aga1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 287	<i>a1 b1 tor1^{lox}</i>	Este trabajo
AUM 30	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 aga1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 33	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 aga1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 35	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 iml1Δ</i>	Este trabajo
AUM 39	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 aga1Δ</i>	Este trabajo
AUM 45	<i>a1b1 P_{tef1}:maf1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 57	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 iml1Δ tsc2Δ</i>	Este trabajo
AUM 63	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bw2 P_{Tef1}:maf1-3HA</i>	Este trabajo
AUM 8	<i>a1b1 rct1^{nar1}</i>	Este trabajo
AUM 87	<i>a1b1 rpt1^{lox} P_{crg1}: cre1-RE</i>	Este trabajo
AUM 89	<i>a1 b1 rct1Δ</i>	
AUM 89	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 rct1Δ</i>	Este trabajo
AUM 90	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 sin1Δ</i>	Este trabajo
AUM 94	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 tor1^{lox} P_{dik6}: cre1-RE</i>	Este trabajo

Materiales y métodos

AUM 97	<i>a1 b1 sin1Δ</i>	Este trabajo
AUM 98	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 sch9Δ</i>	Este trabajo
FB1	<i>a1b1</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2b2</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
UMP 121	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{dik6}:NLS-3GFP</i>	P-Martin
UMP 121	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 P_{dik6}: NLS-GFP</i>	Este trabajo
UMP 336	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 gtr1Δ</i>	Este trabajo
UMP 337	<i>a2 P_{nar1}: bW2 P_{nar1}:bE1 gtr1Δ nar1Δ</i>	Este trabajo

Tabla 1. Estirpes de *U.maydis* empleadas en este estudio. Se representa en genotipo, origen y referencia.

Estirpe	Genotipo
SMUT1	CGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG
SMUT2	GTAGAAGTAGTAGAAGTGATAGTGGTAGTA
SMUT3	ATTCACGTTTTGTAGCACACGACTCACATC
SMUT4	CACCACCCAATCGACGCGGAAGGCAACCCA
SMUT5	TTAGCTCAACTTTTCATCGTGCCCAGAT
SMUT6	TACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGC
CBX1	TCTGGGTTTCGCGAGAGATCTCACAGAGCA
CBX2	AATTGCACAGATCAAGAAGGACATGGCCGT
CBX3	ACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAAT
NAT1	TGGCTGCTGATCACAGCAAGTCAGATT
NAT2	TGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCT
G418-1	GCTCGGTACGGGTACATCGGATCTGCCGGC
G418-2	CTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCT
Ptef-1	GGCGCAAGAAAATTTTTCTCTGGTTCTG
Pnar-1	GGTGAATAGTGAGAACAGTCTCGATCACTC
Pcrg1	GAGATCACGACACCGCGAGGTTTGC GG TGA
dik6-1	AAGCATATATACCCGGCCTTCTTGCTC
GFP1	ACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG
HA/MYC	TCGCAAGACCGGCAACAGGAT TCAATC TTA
tor1 -1	CCGCCAACCAGCTGTTGCAAGACCCTCAAG
tor1 -2	GCGTTAATTAACGACAAGACCAAAAAGGTCTTTGG T
tor1 -3	GGTGGCCATCTAGGCCAGCTGCACCCTCGCTTGA ACGAA
tor1 -4	TAGGCCTGAGTGGCCATAATGTCCGTCCTTGGCAC CCATCAG
tor1 -5	CGCTTAATTAACAAAGCCGATTGTTTCAAACGTCT G
tor1 -6	TGCAGGCCCTCCTTGACGCAGGCCAGGACT
GFP ECO_1	TCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT TC
GFP ECO_2	CGCGAATTCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA GTGAT
tor1 COIP N1	CACCGCTCCCTCTTCGCAGCCTCTCCCAACCG
tor1 COIP N2	GTGGTTTAAACGACGTCCGGCAAAGTGCTCGAGG CC
tor1 COIP N3	GGTGGCCATCTAGGCCTATGATGACGGTGATGAC AATGTGCGG
tor1 COIP N4	CGCGGCCGGAGCGGCCATGTCCGTCCTTGGCACC CATCAGAGC
tor1 COIP N5	TTTCGTTTAAACGTCTGTGCTGACTCCTTGGGCGA TCGG
tor1 COIP N6	CAGAGAAAGATGGGGCCTTCGGGTGGGGCG
tor1 FRT_2	CACGTTTAAACACGCCGGGGCAAGATCTGTACCG

	AGTG
<i>tor1</i> SFI_1	CATGGCCGCGTTGGCCCTCTCTTGTTCATCCTT TTGTTCA
<i>tor1</i> SFI_2	ATAGGCCTGAGTGGCCCGCTCAATGCTGAGTGGG AGGCTGCTG
<i>tor1</i> FRT_5	GACGTTTAAACTGCTCAAGCGCGGCTTCCAGTTTA ACG
<i>tor1</i> FRT_6	CAGATCCTTGCTCGTTTGCTCAGCTAGACAC
<i>rpt1-1</i>	CCACACGCGTTTCGAGCTACTGCTCACGGCT
<i>rpt1-2</i>	CGTTAATTAAGCTTTGGACACACGGGCATATTTTG G
<i>rpt1-3</i>	CGTGGCCATCTAGGCCGCTTGAGGGTGTGTCGT GGTGTTC
<i>rpt1-4</i>	TAGGCCTGAGTGGCCTCCCCTCCATCAATCAGCAT GGCACAC
<i>rpt1-5</i>	GCTTAATTAACGGTCACGATCGCCGGAGCGGTTAT GACC
<i>rpt1-6</i>	GTGGATAGACTCGCGCAAAGGGAAATGTGG
<i>rpt1_PTEF_LOX_1</i>	GCACCACGTTTGTAGTCCC GG CAGAGGTCTTCC
<i>rpt1_PTEF_LOX_2</i>	CGTTAATTAAGCTTTGGACACACGGGCATATTTTG
<i>rpt1_PTEF_LOX_3</i>	GTGGCCATCTAGGCCGATGGAGCTGCATTCAAAT ATGGATG
<i>rpt1_PTEF_LOX_4</i>	GCGGCCGGAGTGGCCTCCCCTCCATCAATCAGCA TGGCACAC
<i>rpt1_PTEF_LOX_5</i>	GCTTAATTAACGGTCACGATCGCCGGAGCGGTTAT GA
<i>rpt1_PTEF_LOX_6</i>	GGGAAGCACCTCATCTGGACCGCAAGCAGCGAG
<i>rpt1_LOX_1</i>	GCCTGAAGCGAGCCTGGTGGCCTTGTGGGA
<i>rpt1_LOX_2</i>	AGCGTTTAAACGTGCATCTGCAGAAGCGTGGCTC G
<i>rpt1_LOX_3</i>	CATGGCCGCGTTGGCCGTCTTTCGTTTCGTGAGCA CCGCTGACG
<i>rpt1_LOX_4</i>	ATAGGCCTGAGTGGCCGCACATGCGGAGTCAAGA CACTTGACG
<i>rpt1_LOX_5</i>	TGCGTTTAAACGATCTGGACGACGATGCGATTCT
<i>rpt1_LOX_6</i>	TTGCGTATCTGCTTTCTGCTACAGGTCTGT
<i>riCTOR1-1</i>	AGTGAGCTTTCGAAGACCATCATGAGTTGC
<i>riCTOR1-2</i>	CGTTAATTAAGCCAGGGTGAGCAGCTGCTCGCGA CG
<i>riCTOR1-3</i>	GTGGCCATCTAGGCCAGCGATTTACAGCAAGAG CAGATTGA
<i>riCTOR1-4</i>	TAGGCCTGAGTGGCCGGCGGTGATCGCGCTGTTG CTCGCTCG
<i>riCTOR1-5</i>	GCTTAATTAATGTGACGAGACGATTGATTTGGTC GATC
<i>riCTOR1-6</i>	CGCGCAACTCTTTGCCTGCTCGATCGCACA
<i>riCTOR1Sfil-1</i>	CATGGCCGCGTTGGCCTTCAAGCACGGTATCTCAA AGCTCCAG
<i>riCTOR Sfil-2</i>	ATAGGCCTGAGTGGCCCTCGGCGCTACCGTTTTT

	GGCGACGTC
<i>ric1FRT*_6</i>	GCTGTTTAAACCTTGCAACTCGATCCTGGCAGCT AATG
<i>ric1FRT*_9</i>	CTGGTTTAAACCAGCATCGAAGGGTGATGGAGCC GCG
<i>ric1FRT FRT*_10</i>	CATCCCTGACGACGTCAATCGGCTGGTCTC
<i>ric1FRT*_11</i>	CATCTCGTTTAGCTGGTCTGGATTCGTGCG
<i>sin1-1</i>	ATGTTGGATGTATTCGTGTTTCGAGTAGCT
<i>sin1-2</i>	CCGTTTAAACAGGATAAGTCCATGGTTGATTTGAG G
<i>sin1-3</i>	GGTGGCCATCTAGGCCTTGAATGATGGACGGTTG AAAAGGCGC
<i>sin1-4</i>	ATAGGCCTGAGTGGCCGAGATGTCGATCAGCAGC GTCACCCAT
<i>sin1-5</i>	CCGTTTAAACTTGGACTCAGTTAAGCTCTCTGCGT AT
<i>sin1-6</i>	AAGAGCGAGCCGTGAGAACATTGTCTCGAC
<i>sin1LOX -1</i>	GATGCGTATACGAACATCGCAAGGAGGACG
<i>sin1LOX -2</i>	AGCGTTTAAACAAGATGGGAGGTGCGGGCGAATC G
<i>sin1LOX -3</i>	CATGGCCGCGTTGGCCTTCACGATTAGCTGGGCG CACAGACAG
<i>sin1LOX -4</i>	ATAGGCCTGAGTGGCCTTGGGCACAGCTCGACGA GGATCACTG
<i>sin1LOX -5</i>	TGCGTTTAAACTGATGCTTCCCGCTCGGTGAGAC
<i>sin1LOX-6</i>	AGAGATGTATGTATGGACCGCTTCAACTA
<i>D_tsc2-1</i>	GGGGACTGGACGCGTACCTTGGATCGTGAG
<i>D_tsc2-2</i>	GCGGTTTAAACACCATGCCAGCCGTGTCGAGCGC GATG
<i>D_tsc2-3</i>	ATAGGCCTGAGTGGCCGTGCCTACTCGTGTAATG CGTTGTCTG
<i>D_tsc2-4</i>	GGTGGCCATCTAGGCCGGTTGCAACCGCGTCAGT GTTGAGC
<i>D_tsc2-5</i>	GCCGTTTAAACCAATACCAATACGAAATCCGAC CCGTC
<i>D_tsc2-6</i>	CAGAAACTCACAAGTATTGCTCCAAGTGG
<i>tsc2-GFP-1</i>	CCTTACATATCGCGCGCCTGCTCAAGGCC
<i>tsc2-GFP-2</i>	CTAGCTCTTCGGTGAGTTTAAACTCAGCAGGTCCA AGCAGGGGCAAGGAC
<i>tsc2-GFP-3</i>	CTAGCTCTTCTCGAGAAGGATTTTGTGAAATCGTA GAGATC
<i>tsc2-GFP-4</i>	TAGGCTCTTCGCCTGGTGCCTACTCGTGTAATGCG TTGTCTG
<i>tsc2-GFP-5</i>	CTAGCTCTTCGGACGTTTAAACACCATGCCAGCCG TGTCGAGCGCGATG
<i>tsc2-GFP-6</i>	CACCGGTTTCGGCGCCAGGCGCTACGTGTGC
<i>D_im1-1</i>	TCACAGGAAACAATAGCGTCGCAGTGTAGA
<i>D_im1-2</i>	CGCCTTACATCTTGCAAGAATTCATCGGCG
<i>D_im1-3</i>	CAGGTCTCGCCTGCAATATTGCTGGGCGACCATG

Materiales y métodos

D_ <i>iml1</i>-4	CGCGCAATCGGTC CAGGTCTCCAGGCCGAAATTGACACCGCAGCCTG TAGGAATG
D_ <i>iml1</i>-5	CAGGTCTCCGGCCTGACATTTGGTTCATCTACCAG ACGTGA
D_ <i>iml1</i>-6	CAGGTCTCGCTGCAATATTGACAGCCTTCGTTTGC TGCCCGAGCAAC
D_ <i>aga</i> 1-2	CTAGGTCTCGCCTGCGTTTAAACATCAAGCGTGAA GGTTTTTATGTG
D_ <i>aga</i> 1-3	CTAGGTCTCCAGGCCAGGTTCCGGATGCAGATATG GATACC
D_ <i>aga</i> 1-4	TAGGGTCTCCGGCCTCTCTTGGTTTGGCACTCACG AATG
D_ <i>aga</i> 1-5	CTAGGTCTCGCTGCGTTTAAACGCAAATACTCGCT GCAGTTTCGAG
<i>aga</i>1-8	GATCAGTTGAGCTGTGTAGTGGCTGTGGTA
<i>aga</i>1-10	AGCAAATCGTGAATACAAGTCGTGAGTGCA
PTEF_LOX_P_ <i>adr1</i>_1	CTGGCGCTTGCTCGTTTGGAGGAATGCCGG
PTEF_LOX_P_ <i>adr1</i>_2	AGATGTTTAAACAGCTGCCTCGATGAGGATGGATG TATG
Ptef_LOX_P_ <i>adr1</i>_3	TGGTGGCCATCTAGGCCAAAGCACACACAATTCCT AAGCGCCAA
Ptef_LOX_P_ <i>adr1</i>_4	TCGCGGCCGGAGCGGCCGTCTTCATTCACACTAC GTTACTTTGT
Ptef_LOX_P_ <i>adr1</i>_5	CTGGTTTAAACGGCGTTCGAGTGTTGAGACGCAG CAAG
Ptef_LOX_P_ <i>adr1</i>_6	GATGACGACGCCCCACCTCCTGCTGTGCTG
<i>adr1</i>_LOX_GFP_1	TGCATCTGGTGCCTTCGCGCCACAACCACC
<i>adr1</i>_LOX_GFP_2	ATCGTTTAAACACACGAATTCGGAACGTGCGATCC
<i>adr1</i>_LOX_GFP_3	CATGGCCGCGTTGGCCAAGAATGCCTTTAGTTCCG CCGTGAAA
<i>adr1</i>_LOX_GFP_4	ATAGGCCTGAGTGGCCCAACGCAGCTTCTACAATT CGGCGTGT
<i>adr1</i>_LOX_GFP_5	ATCGTTTAAACTTGGACACGTTGTCTCGATCTCGA
<i>adr1</i>_LOX_GFP_6	ACGCTCTCACGCTCACACCAGCTTGGCTTG
D_ <i>nar1</i>_1	TGGTAAAAAAAAAACAAAAACCCCAAACAAAACC GGTTCGCTTTACGTT
D_ <i>nar1</i>_2	CTAGCTCTTCGGTGAGTTTAAACGGCCGGCAAAG GCACCGCGTTCAG
D_ <i>nar1</i>_3	CTAGCTCTTCAGGCCACTTGCGACGCACAAGCTA GCAGAAG
D_ <i>nar1</i>_4	TAGGCTCTTCGCCTGTTCTGCTCATTATTTGCAATC TTAC
D_ <i>nar1</i>_5	CTAGCTCTTCGGACGTTTAAACATGCTCAAGACGG TCGAAGGAGCGAG
D_ <i>nar1</i>_6	TTTCTACCAATCGGAAGTCATCCGATCCTTC
D_ <i>dik6</i>_1	GGAGGTTTTCTGTTATTTTTGTGGAGTCG
D_ <i>dik6</i>_2	CTAGCTCTTCGGTGAGTTTAAACGTGTAACCGAAT TTTCTCATGAATG

Materiales y métodos

D_dik6_3	CTAGCTCTTCAGGCCGTTGCTGGGATCGAATGGCT GTCTGTA
D_dik6_4	TAGGCTCTTCGCCTGCTTGCACCAAGGCCTTGAAG CCGATGC
D_dik6_5	CTAGCTCTTCGGACGTTTAAACTTTCTCGATATCGA CGATGAGCT
D_dik6_6	CGAAGTGTGCGATCCGAAGTCTGTAGACCC
D_sin1_1	CCGCAGATGTTGGATGTATTCGTCGTTCTGA
D_sin1_2	CTAGGTCTCGCCTGCGTTTAAACGAGCGAGCAGG TGCCCACTGGTGC
D_sin1_3	CTAGGTCTCCAGGCCGCTGCTGATCGACATCTCC CTTGAATG
D_sin1_4	TAGGGTCTCCGGCCCATCCCGCAAGGAGAGCGGT GAGCGGT
D_sin1_5	CTAGGTCTCGCTGCGTTTAAACGCCGTCGAAAGG CTGTAAGCGAAAG
D_sin1_6	GTGCACAGCCTGGTGAGGGAAGACACTGAG
D_rct1_4	ATA GGC CTG AGT GGC CGG CGG TGA TCG CGC TGT TGC TCG CTC
D_rct1_5	GCT TAA TTA ATG TCG ACG AGA CGA TTG AT
D_rct1_6	GCG TGG CGG AGT AGG CGG TAG GTG GCA GCG
D_sch9_1	GCCCTCGAACATCTGCACAAGTACGATATC
D_sch9_2	GACGTTTAAACATTTTGGCTCGATGCCACTGGCCA
D_sch9_3	CATGGCCGCGTTGGCCGGTGCAAGAGAGATGTAC TTCATGTAT
D_sch9_4	ATAGGCCTGAGTGGCCATTTGCGACAGTTACACAA GTTTCATT
D_sch9_5	GTCGTTTAAACCAATCACATCGCTTTACGTCACA
D_sch9_6	GCTCATCACCAACCAAGCTCCCGCCGTCCTCA
D_atg1_1	GGTGGGTTTCATGGTTTTGTTTCGAGGTTTCGTG
D_atg1_2	GGGGTTTAAACAAGGAATTTTCGGTAAGTTAAGCAA GATC
D_atg1_3	GGTGGCCATCTAGGCCGGGGTCTGGCGTGAGGTA TGCGGTCTTG
D_atg1_4	ATAGGCCTGAGTGGCCCGGAGTGGTTTGGTCTGA AAGGGATGGC
D_atg1_5	GCCGTTTAAACGAAGAGCTGCACGGCCCTGCCAT CAAG
D_atg1_6	GGCGAGAGTCACAAGAAGCGCAAACGTACC
dik6 GFP_1	CCTATTTGCATGGGATTCCCTTGCCATGATC
dik6 GFP_2	CGGGGTTTAAACCGCCCAAGAGGTGGTACTAT G
dik6 GFP_3	TGGTGGCCGCGTTGGCCGCCCTTGAATGTTTGAT CGGACGATCC
dik6 GFP_4	TGGTGGCCGCGTTGGCCGCCCTTGAATGTTTGAT CGGACGATCC
dik6 GFP_5	AATAGGCCTGAGTGGCCCTTGCACCAAGGCCTTG AAGCCGATGC
dik6 GFP_6	AATGTGCTCGAAGTGTGCGATCCGAAGTCTG

<i>aga</i> _1	TCAGCGACATCTACCTCGGCGGGCGTCAAGT
<i>aga</i> _2	GCTTAATTAACCAGAGAACCTCGGATGCTTCCTAT C
<i>aga</i> _6	TCTGGCCTGAGTGGCCAGACGCACGAGAAGCATA CAGTAT
<i>aga</i> _7	GCTTAATTAATCGTAGACCGTTCATGCACCACATG
<i>aga</i> _8	GATCAGTTGAGCTGTGTAGTGGCTGTGGTA
<i>aga</i> _9	GTAGGCCGCGTTGGCCTCTCTCAAGCTCTCGCCT GCACCAAGC
<i>ubc1</i> -GFP_1	GCAGGATCAGTACCGCGATGTGTTGCTCGC
<i>ubc1</i> -GFP_2	CTAGCTCTTCGGTGAGTTTAAACAAGGCGCTCAGG GAGATTATTTTTACG
<i>ubc1</i> -GFP_3	CTAGCTCTTCTCGAAGCAAACGGATTTCGGCGCGCT CCATGC
<i>ubc1</i> -GFP_4	TAGGCTCTTCGCCTGCGCAGCCCAGTGCGCCTGC TTTGGATG
<i>ubc1</i> -GFP_5	CTAGCTCTTCGGACGTTTAAACAGTCTCGAGTCTC TCTCTAGCGTC
<i>ubc1</i> -GFP_6	CCGAATCAACCTCGCTCGTCTGCTTTCAAC
GFP <i>rheb1</i> _1	ACATTCACGATTCATGCTGTTGTGCTCTCA
GFP <i>rheb1</i> _2	ACGTTTAAACAAGACTCATGACTGTGAGAGACG
GFP <i>rheb1</i> _3	TATGGCCATCTAGGCCGGTGC GCGGTAAGAAGCG TTATCGAAT
GFP <i>rheb1</i> _4	ATAGGCCTGAGTGGCCCCATGTCTGCTGCTCCGG GAAGCTCGACC
GFP <i>rheb1</i> _5	CAGTTTAAACAGCCGCACGATCCAGAGGCGATC
GFP <i>rheb1</i> _6	CGTCCCAGCCACCTCGGCCAAACTCATCCA
<i>rheb1</i> _7 CHECK POP- OUT	GGCTCATCCGATTTGCATCACATAGCC
<i>rheb1</i> _8 CHECK POP- OUT	CGGAACGAGAGCCGAGAACGGCAATCT
<i>atg8</i> _1	GCAGCGCGGTCCCTCTGTGCTTGTTCGATG
<i>atg8</i> _2	CGTCGCGTTTAAACAGCCAAGATGAAAAAGCACG GAGGCGT
<i>atg8</i> _3	GGTGGCCATCTAGGCCCGTGGCGCTATAAGACTC GAAACGTTAC
<i>atg8</i> _4	CGCGGCCGGAGCGGCCCGTTCCGCATTCAAGAAC GAGCACTC
<i>atg8</i> _5	GGTGTTTAAACCACAGGTCTCGAGCTTGAGACATG C
<i>atg8</i> _6	GCACGCAGATTCACGATTCTCTTTCTCTC
<i>maf1</i> _2	CCTTAATTAAGTGCCGAGCCTGAAGAAGAGGGCG ATC
<i>maf1</i> _3	GTAGGCCGCGTTGGCCGCGGGCTGCTTCTTAACG CGTTTCTGAT
<i>maf1</i> _4	ATAGGCCTGAGTGGCCGCGCCATGGCCCTCAGTT CACTTTGAC
<i>maf1</i> _5	GGTTAATTAAGATGCGCAGCTCAAGATGGAACAAA
<i>maf1</i> _ectópico	GCACCATATGAAATACCTCGAGTATCCCGAGCTC

Materiales y métodos

123_cpy_1	CTACCCGGGATGCGATCCTCTTGGCTCTCGACCG CT
123_cpy_2	TGGCCATGGAGGCAAGCGGCTTGTTTGCAGCCAGC
123_cpy_Check_1	GGGCCGTAGAGACGACTCCAACAGTAG
123_cpy_Check_2	CTACTGTTGGAGTCGTCTCTACGGCCC
adr1F	ATCATATGTCTGCTATTCCACAACAGCCCGTCG
adr1R	TGCTTAAGCAAACCACCGCTTCCGCACACGCCG
ubc1F	ATCATATGTCTGCTACCATCTAGCTACACTGCTC
ubc1R	TGCTTAAGCGGAGCTTGCCACACACTCGGCCA
Rheb1-NdeI	GCTCCATATGATGTCTGCTGCTCCGGGAAGCTCGA CC
rheb1-EcoRI	AGGCGAATTCCTACATGACGATGCACTTGCTAGGT TG
rheb1 Q71L CHECK	CTGACCTCGATCCAAGCCGCCTTGAGC
rheb1KR-1	GCCCTGCGTGATCGTTGGGCAGAGGAGCGATTTA CATGTGCAGAGAC
rheb1KR-2	GTCTCTGCACATGTAAATCGCTCCTCTGCCCAACG ATCACGCAGGGC

Tabla 2. Tabla de Oligonucleótidos empleados en este estudio. Se representa nombre y la secuencia de bases nitrogenadas que los componen.

NOMBRE	SECUENCIA
<i>tor1-A</i>	TTGCTGGACTCAAGAGCAGA
<i>tor1-B</i>	GAACGAGGAGAGGCTGTCAC
<i>raptor1-A</i>	CGTAACAACAACGGGTCCTT
<i>raptor1-B</i>	GCATCGTCTTCCTCTTCAGG
<i>riCTOR1-A</i>	ACGATCTTTGGCTCTCATGC
<i>riCTOR1-B</i>	AGTTTGAACGGTTGGTGAGG
<i>sin1-A</i>	GAACGCCTCGATCTTCAAAC
<i>sin1-B</i>	CTTGTACGCAGCAGCAATGT
<i>tsc2-A</i>	ACACGCCGAGATGGTAATTC
<i>tsc2-B</i>	AGGGTGTGCTCTTGAGCTGT
<i>iml1-A</i>	GACTCACGATCCACCCAAC
<i>iml1-B</i>	GGCAAGGTGAGCTGAAGAAG
<i>sch9-A</i>	ACCTCACCGTCAAATCGTC
<i>sch9-B</i>	GGCCGATGAATTCGTTCTTA
<i>aga1-A</i>	CCTCGCTCAGGTCTCTTGAC
<i>aga1-B</i>	GTGTTCCGATTGTGTTGTGC
<i>nar1-A</i>	CGTATCCACCGAGTCGAAAT
<i>nar1-B</i>	TCGGATACATGCGGTACAGA
<i>dik6-A</i>	GCCATGATCATTTCCTCGTT
<i>dik6-B</i>	GCTGATGTAGGCACTCACGA

Materiales y métodos

<i>atg1-A</i>	CCACCGACGAGCTAGAGAAC
<i>atg1-B</i>	GGATCCAGCAACGAAGAGAG
<i>rpl43B_A</i>	CGAACTGTCAAGGTCGGAAT
<i>rpl43B_B</i>	ACTTGGAGTGCTGCGAGATT
<i>s21b-A</i>	ACCAACTTCCCCCTGTCTG
<i>s21b-B</i>	CTGGTAGCTCCAGACGTTGC
<i>adr1-A</i>	TCTACGCGATCAAGGTGTTG
<i>adr1-B</i>	AGATTCACGAGGAACGGATG
<i>ubc1-A</i>	ATTATTGTGGAAGGCGATGC
<i>ubc1-B</i>	TTGTTCAACAGTGCCAGCTC
<i>tub1-A</i>	CGAGATGACCTTCTCGTCGT
<i>tub1-B</i>	AACATCACCACGGTACAGCA
Rt <i>maf1-A</i>	TGGAAAATTCGAGCCTCACT
Rt <i>maf1-B</i>	CAAACGTGACCATAGCAGA

Tabla 3. Tabla de oligonucleótidos empleadas en este estudio para el análisis por RT-PCR de los diversos genes delecionados. Se representa nombre y secuencia de bases nitrogenadas que los componen.

RESULTADOS

El complejo TOR en *U. maydis*

Ustilago maydis infecta las plantas de maíz mediante el uso de una estructura especializada llamada filamento infectivo, que resulta del apareamiento de dos células haploides sexualmente compatibles. Esta estructura consiste en una única célula dicariótica, que tiene su ciclo celular detenido en G2. A pesar de no poder proliferar en la superficie de la planta, esta hifa se alarga para producir un filamento de aproximadamente 100 μm de longitud (mientras que las células vegetativas tienen aproximadamente 17 μm de longitud), lo que supone un aumento de casi 5 veces su volumen celular. No se sabe cómo se regula este espectacular crecimiento celular. En organismos eucarióticos, la ruta TOR regula positivamente los procesos de transcripción y traducción con el fin de promover el crecimiento celular (Saxton and Sabatini, 2017a). Por ello nos preguntamos si en *U. maydis* la actividad de dicha ruta era necesaria para promover el crecimiento del filamento infectivo. En el momento de comenzar esta Tesis no existía ningún trabajo previo acerca de la caracterización de la ruta TOR en *U. maydis*. Tan solo existían referencias en un par de revisiones de análisis filogenético de la ruta TOR en hongos acerca de la posible existencia de componentes de dicha ruta en *U. maydis* (van Dam et al., 2011; Liu et al., 2012b; Tatebe and Shiozaki, 2017). Por ello, nuestra primera aproximación fue buscar dichos componentes por similitud de secuencia usando como molde las proteínas de las levaduras de gemación y fisión (Fig.1).

<i>U. maydis</i>	Annotation number	<i>S. cerevisiae</i> (E value)	<i>S. pombe</i> (E value)
Tor1	<i>umag_03216</i>	Tor1 (0)	Tor2 (0)
Tor1	<i>umag_03216</i>	Tor2 (0)	Tor 1 (0)
Lst8	<i>umag_03059</i>	Lst8 ($3e^{-128}$)	Wat1 ($2e^{-152}$)
Rpt1 (Raptor)	<i>umag_00801</i>	Kog1 ($1e^{-127}$)	Mip1 (0)
Rct1 (Rictor)	<i>umag_06215</i>	Avo3 ($1e^{-78}$)	Ste20 (0)
Sin1	<i>umag_00947</i>	Avo1 ($1e^{-11}$)	Sin1 ($5e^{-22}$)

Fig. 1. Componentes centrales de la ruta TOR en *U. maydis*. Se indica la secuencia codificante putativa (*annotation number*) con mayor índice de similitud (E value) a nivel de secuencia de aminoácidos, tras una búsqueda en el genoma anotado de *U. maydis*, usando tanto las proteínas de *S. pombe* como las de *S. cerevisiae*.

Encontramos que en *U. maydis* existían posibles homólogos para todos los componentes del núcleo central tanto de los complejos TORC1 como TORC2. En general todos los componentes mostraron mayor similitud de secuencia con los equivalentes de *S. pombe* que con los de *S. cerevisiae*. Además, a diferencia de lo que ocurre en ambas levaduras, en *U. maydis* solo existe un gen con capacidad para codificar la kinasa Tor1.

Inhibición química de la actividad Tor1 en *U. maydis*.

La actividad de los complejos TOR puede ser inhibida químicamente empleando drogas cuyo mecanismo de acción es muy selectivo (Fig.2). Una de las más usadas es la Rapamicina que ejerce su función a través de un complejo con la proteína FKBP12, que se une directamente al dominio FRB de la kinasa Tor1 (Heitman et al., 1991; Gaubitz et al., 2015; Nasr et al., 2015). Hay que tener en cuenta que este dominio de Tor1 solo está accesible cuando está formando un complejo con la proteína Raptor, y no cuando lo hace con Rictor o Sin1 y por ello, tratamientos con Rapamicina solo inhiben las actividades asociadas a TORC1. Para una inhibición de todos los complejos asociados a la kinasa Tor1, se suele usar la droga Torin1 que es un análogo competitivo del ATP específico para Tor1, y por ello no hace distinción entre las actividades de TORC1 y TORC2 (Liu et al., 2012a; Luo and Wang, 2017).

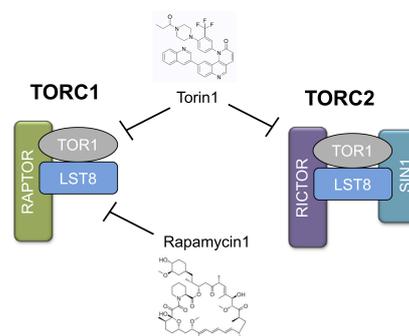


Fig. 2. Drogas utilizadas en este estudio para inhibir la actividad TOR. Torin1 al actuar directamente sobre la kinasa Tor1 inhibe ambos complejos, TORC1 y TORC2, mientras que Rapamicina solo es capaz de inhibir TORC1.

Nosotros realizamos un análisis del crecimiento de células de *U. maydis* en medio líquido suplementados bien con Rapamicina o con Torin1, a distintas concentraciones. Observamos que *U. maydis* es sensible a ambas drogas, aunque fue mucho más sensible a Torin1 que a Rapamicina (Fig. 3A). Esta mayor sensibilidad se correlacionaba también con mayor efecto morfológico en los tratamientos con Torin1, con células que acumulaban una gran vacuola central y perdían su capacidad para crecer de un modo polar (Fig. 3B). La distinta sensibilidad a Torin1 y Rapamicina también se observó cuando realizamos ensayos en medios sólidos (Fig. 3C).

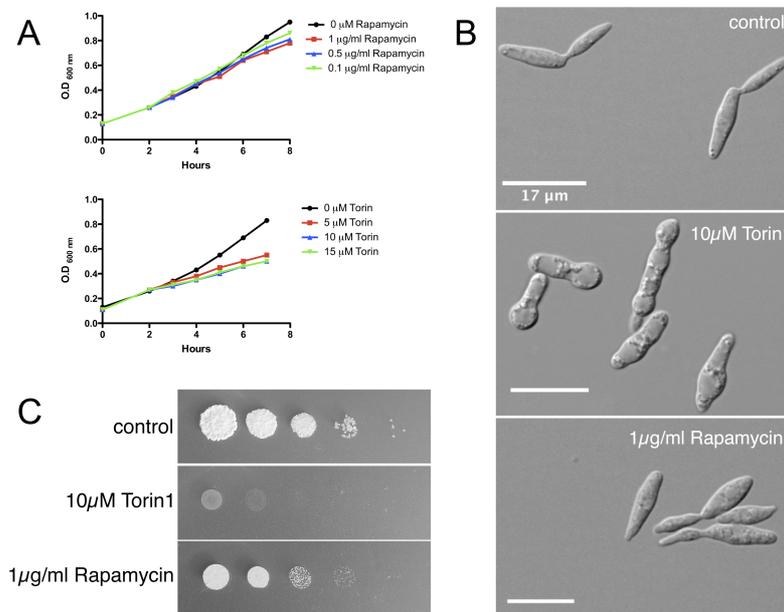


Fig. 3. Sensibilidad de *U. maydis* a inhibidores de la ruta TOR. **A.** Medida del crecimiento mediante el aumento de la turbidez (OD₆₀₀) de los cultivos en medio rico (YPD) tratados con las concentraciones de droga indicada. **B.** Aspecto de las células en medio rico (YPD) tras tratamiento de 8 horas con la concentración indicada de droga. **C.** Crecimiento en medio sólido (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) tras una incubación de 2 días a 28°C.

Para cuantificar la diferente inhibición de la actividad TOR provocada por Rapamicina o Torin1, utilizamos dos sistemas reporteros bien establecidos. El primero de ellos fue la expresión de los genes ribosómicos. Como se comentó en la Introducción, la actividad TORC1 regula de una forma positiva la transcripción de los genes ribosomales (Jorgensen et al., 2004; Marion et al., 2004). Esta regulación parece estar muy conservada en la escala filogenética.

Por ello, decidimos llevar a cabo un análisis vía RT-PCR de la expresión de dos genes ribosomales en células tratadas con las drogas Rapamicina y Torin1. Se usaron los genes *rpl43* y *s21b*, que codifican proteínas que forman parte de la subunidad mayor y subunidad menor del ribosoma, respectivamente. Como se observa en la Fig. 4, la expresión de ambos genes decreció en células tratadas con ambas drogas en comparación con el control, siendo este efecto más patente en células tratadas con Torin1 que con Rapamicina, lo cual era coherente con los efectos observados en el crecimiento de las células en presencia de ambas drogas.

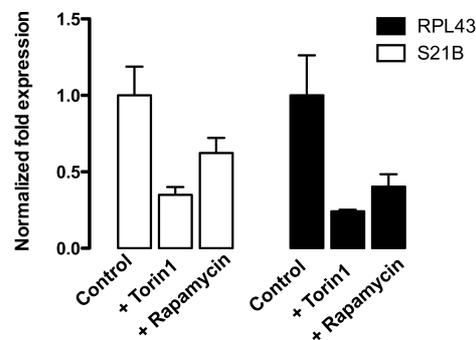


Fig. 4. Efecto de la inhibición química de la ruta TOR en la transcripción de genes ribosomales. RT-PCR cuantitativa para los genes indicados en las distintas condiciones (Torin1, 10 μ M y Rapamicina 1 μ g/ml, medio YPD). La estirpe de partida fue FB1. El ARN se aisló después de 8 horas de incubación a 28°C. Como control interno, se usó la expresión de *tub1* (que codifica Tubulina α). Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (YPD, sin droga añadida). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes.

El segundo sistema reportero que utilizamos fue la capacidad de TOR para reprimir autofagia. Un descenso en la actividad TORC1 se traduce en un incremento de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011) ya que con baja actividad TORC1 se inhiben los procesos anabólicos y se activan los procesos catabólicos. Para analizar el estado de la autofagia, se usó una fusión GFP-Atg8. Atg8 es una proteína que decora tanto la parte exterior como la interior de los fagosomas. Cuando el fagosoma se fusiona a los lisosomas, la proteína Atg8 que queda en la cara interior del lisosoma se degrada por la acción de las proteasas lisosomales (Fig. 5A).

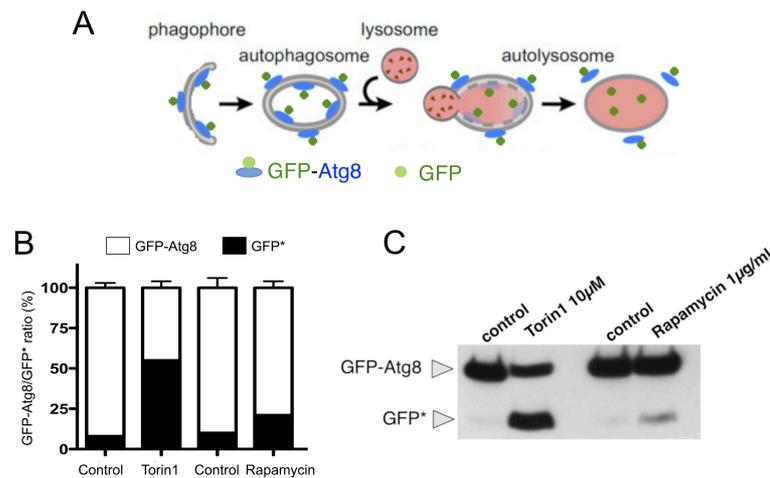


Fig. 5. Aumento de la autofagia tras la inhibición de la ruta TOR en *U. maydis*. **A.** Esquema mostrando el fundamento del sistema reportero de GFP-Atg8. **B.** Cuantificación del nivel de autofagia, medida como la razón entre los niveles de GFP-Atg8 y de GFP liberada (GFP*) medidos por un análisis de *western blot* tras el tratamiento de cultivos celulares de la estirpe AUM171 con la droga indicada durante 6 horas. Se muestra la media de tres gels independientes. **C.** Autorradiografía de uno de los gels usado para el análisis.

Si esta proteína está fusionada a GFP (cuya estructura en barril la hace insensible a las proteasas vacuolares), una autofagia activa dará como resultado una acumulación de GFP libre en el lumen de la vacuola, de tal manera que mediante un ensayo de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP se pueden detectar si el proceso autofágico está activo o no. Una tasa autofágica elevada generará 2 bandas: una superior (40 kDa) correspondiente al tamaño de la fusión de GFP-Atg8 y una inferior (27 kDa) correspondiente al tamaño de la GFP, mientras que la ausencia de autofagia solo genera la banda superior correspondiente al tamaño de la fusión GFP-Atg8. Así haciendo una relación entre la intensidad de la banda que migra mas rápido (GFP*) con respecto a la que migra mas lento (fusión GFP-Atg8) se puede monitorizar la tasa autofágica. Como se observa en la Fig. 5B y C, las células tratadas con ambas drogas presentaron un incremento en la banda inferior correspondiente a la GFP*, y esta banda presentaba una mayor intensidad en el caso de las células que fueron tratadas con Torin1.

En resumen, estos resultados indicaban que en *U. maydis* la actividad TORC1 podía ser reprimida con tratamientos con las drogas Torin 1 y Rapamicina, aunque presentaban una diferente sensibilidad a estas drogas.

La kinasa Tor1 es esencial para el crecimiento en *U. maydis*.

La actividad de la kinasa Tor1 suele ser esencial en casi todos los organismos en los que se ha estudiado. En *U. maydis*, los resultados obtenidos con inhibidores químicos también lo sugerían, y por ello, decidimos construir un alelo condicional para el gen *tor1* (*tor1^{nar1}*) sustituyendo su promotor nativo por el promotor inducible por nitrato, P_{nar1} , en el fondo genético estándar FB1(*a1 b1*) (Fig 6A). Esta es una manera muy común en nuestro modelo de trabajo de realizar alelos condicionales, ya que permite un apagado y encendido selectivo del gen que se quiere estudiar (Brachmann et al., 2001). Mientras la estirpe mutante está creciendo en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno, el promotor P_{nar1} está activo. Sin embargo, la adición de amonio, o cualquier otra fuente de nitrógeno más compleja tales como aminoácidos o peptona hidrolizada apaga el promotor.

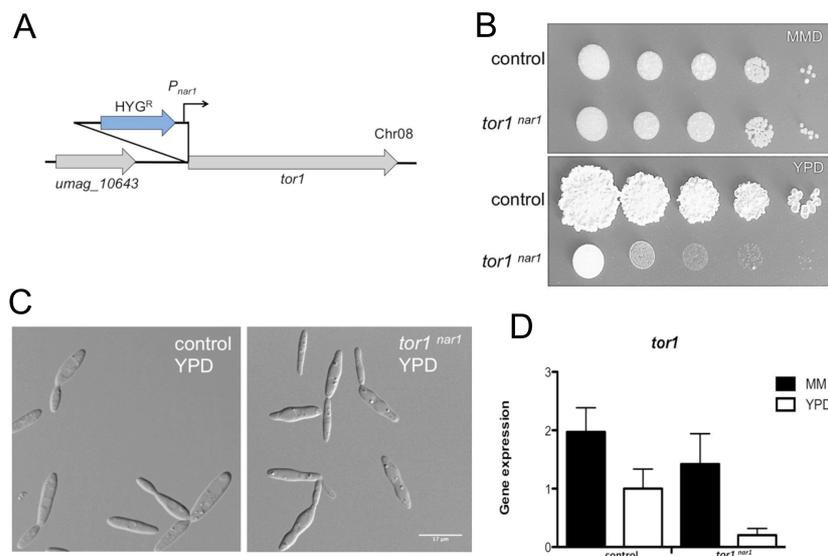


Fig. 6. Expresión condicional de *tor1*. **A.** Esquema del alelo *tor1^{nar1}*. El promotor endógeno fue intercambiado con el promotor P_{nar1} asociado a una resistencia a Higromicina. **B.** Crecimiento en medio sólido permisivo (MMD) y represor (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, FB1 y *tor1nar1*, XXX) tras una incubación de 2 días a 28°C. **C.** Aspecto de las células en medio rico (YPD) tras una incubación de 8 horas a 28°C. **D.** RT-PCR cuantitativa del gen *tor1* en las estirpes y medios indicados. El ARN se aisló después de 8 horas de incubación a 28°C. Como control interno, se usó la expresión de *tub1* (que codifica Tubulina α). Se tomó como valor de referencia la expresión de la estirpe silvestre en condiciones control (YPD). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes.

Cuando la estirpe mutante que llevaba el alelo *tor1^{nar1}* fue crecida en medio solido represor (YPD) observamos un fuerte efecto negativo en su capacidad para producir colonias, aunque aun eran capaces de crecer de una forma muy disminuida (Fig. 6B). También observamos el mismo efecto en medio liquido: las células mutantes eran capaces de proliferar en condiciones restrictivas, aunque a una tasa muy baja y además, aunque estaban afectadas en su morfología, esta era más similar a la que observamos cuando tratábamos con Rapamicina que cuando tratábamos con Torin1 (Fig. 6C). Dado que esperábamos un efecto más drástico en el crecimiento de las células condicionales en condiciones represoras para la expresión de P_{nar1} , analizamos los niveles de transcripción del alelo condicional mediante RT-PCR y encontramos que incluso en condiciones donde el promotor debería estar apagado existía un nivel rezumante de expresión que explicaba este crecimiento residual (Fig. 6D). Este resultado, con una expresión residual en condiciones represoras, no es infrecuente con este tipo de alelos condicionales. Dado que el intercambio del promotor se realiza en el locus del gen que estudiamos, la estructura de la cromatina circundante a veces puede afectar la capacidad para que el promotor P_{nar1} pueda ser apagado en condiciones represoras, como parecía ser el caso.

Como nuestra intención era lograr unas condiciones de falta de función de la kinasa Tor1 lo más estrictas posible, decidimos construir una estirpe en la que pudiéramos hacer una ablación genética condicional del gen *tor1* usando un sistema Cre-Lox que habíamos puesto a punto previamente en el laboratorio.

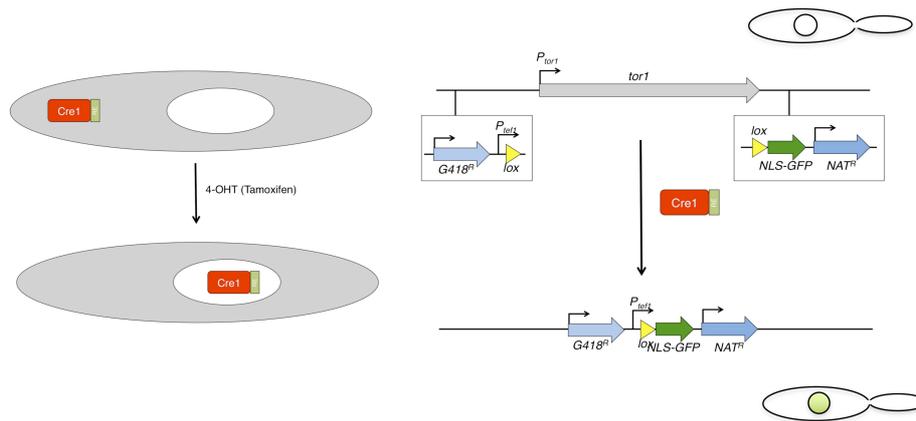


Fig. 7. El alelo $tor1^{lox}$. Se muestra un esquema de la construcción y el resultado de la activación de la recombinasa Cre tras la adición de 4-hidroxitamoxifeno, que induce su transporte al núcleo celular.

En este sistema (Fig. 7), el locus $tor1$ estaba flanqueada por sitios de recombinación lox , de tal manera que en presencia de una recombinasa Cre activa, dicha zona intermedia se expulsaba (alelo $tor1^{lox}$). Además, el diseño del sistema hacía que tras la expulsión de la secuencia intermedia, la secuencia codificante de una GFP con una señal de localización nuclear (NLS-GFP) insertada en la región 3' del gen $tor1$ se acoplase a un promotor localizado en la zona 5', y ello permitía distinguir mediante microscopía de fluorescencia las células que habían expulsado el gen $tor1$ de las que no (las células sin gen $tor1$ tendrían los núcleos fluorescentes). Usamos una variante de recombinasa, Cre-RE, que tiene un dominio de retención en retículo endoplásmico sensible a 4-hidrotamoxifeno (4-OHT), lo que nos permitió mantener a las células con el gen $tor1$ hasta el momento de llevar a cabo los experimentos y delecionarlo de forma controlada añadiendo 4-OHT.

Como se observa en la Fig. 8, este sistema funcionó de un modo muy correcto.

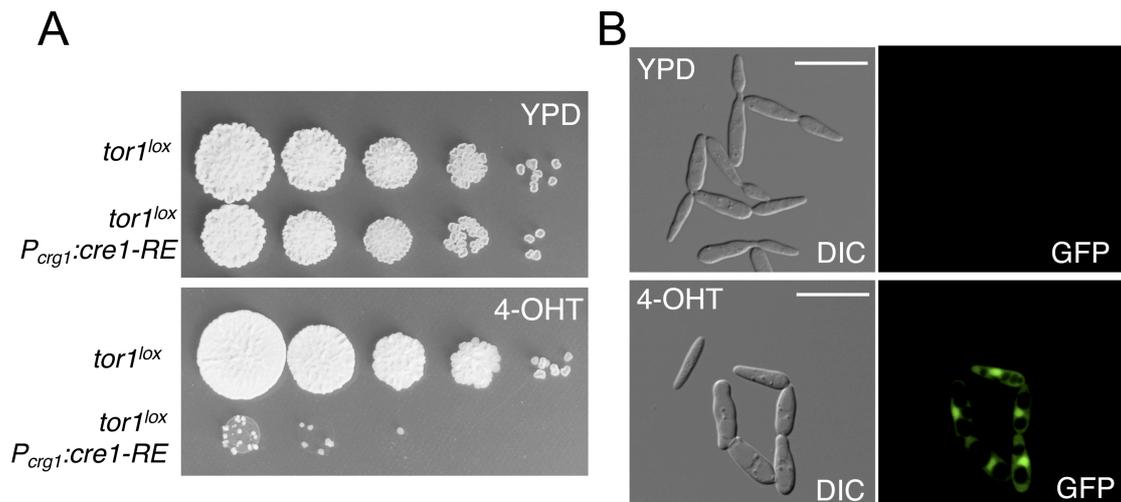


Fig. 8. Ablación genética de *tor1*. **A.** Crecimiento en medio sólido en condiciones de no activación de la recombinasa Cre-RE (YPD) y activación (1 μ M 4-OHT) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (AUM287 *tor1^{lox}* y AUM103 *tor1^{lox} P_{crg1}:cre1-RE*) tras una incubación de 2 días a 28°C. **B.** Aspecto de las células en condiciones de no inducción (YPD) e inducción (1 μ M 4-OHT) tras una incubación de 6 horas a 28°C.

En un análisis de crecimiento en medio sólido se apreció en la estirpe que llevaba el alelo *tor1^{lox}* junto con el transgén que expresaba la recombinasa Cre, una fuerte inhibición de la capacidad para producir colonias sobre el medio inductor sólido (YPD suplementado con 4-OHT 1 μ M), en comparación con la estirpe control sin el transgén que expresaba la recombinasa (Fig. 8A). Además, una observación al microscopio de un cultivo mutante durante un crecimiento de 6 horas en medio inductor con 4-OHT (1 μ M), evidenció la presencia de células con núcleos fluorescentes lo cual indicaba que el gen *tor1* había sido deletado. Estas células mostraban una morfología muy similar a la obtenida en las células tratadas con Torin1 (Fig. 8B).

En resumen, todos estos datos apoyaban la idea de que el gen *tor1* era esencial en *U. maydis*. Además, disponíamos de dos sistemas para eliminar la actividad Tor1: mediante ablación genética (sistema Cre-Lox) y mediante inhibición química, siendo la inhibición por Torin1 más drástica que la ejercida por Rapamicina.

La kinasa Tor1 es necesaria para formar el filamento infectivo en *U. maydis*.

Dado que disponíamos de las herramientas para eliminar la actividad Tor1 en *U. maydis*, intentamos contestar nuestra pregunta inicial acerca del requerimiento de actividad TOR para la formación del filamento infectivo.

La formación del filamento infectivo de *U. maydis* está controlada por un programa transcripcional que se activa por un heterodímero que se une al ADN, llamado complejo b. En la Naturaleza, la formación de este heterodímero requiere el apareamiento de dos células haploides, sexualmente compatibles. Ello es así porque cada estirpe haploide expresa una de las subunidades del heterodímero, que tras la fusión de los citoplasmas resulta en el complejo b (Fig. 9A). En el laboratorio, para evitar el requerimiento de aparearse y usar fondos genéticos haploides, utilizamos las estirpes denominadas AB33 y AB34 (Brachmann et al., 2001). Ambas estirpes son derivadas de la estirpe haploide FB2 (*a2 b2*), pero llevan modificado el locus *b*, de tal manera que AB33 porta los genes *bE1* y *bW2*, codificantes de las subunidades compatibles para la formación de un complejo b activo, mientras que AB34 porta los genes *bE1* y *bW1* los cuales producen subunidades incompatibles y por lo tanto no se forma un complejo b activo. En ambos casos los genes *b* están controlados bajo el promotor inducible por nitrato, *Pnar1* (Fig. 9B). De esta manera, en la estirpe AB33, en presencia de medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno, se induce la formación de un complejo b compatible y esto da como resultado la formación de un filamento semejante a la hifa infectiva formada después de la fusión de dos células haploides compatibles en la superficie de la planta, pero que presenta un único núcleo (haploide) (Fig. 9C).

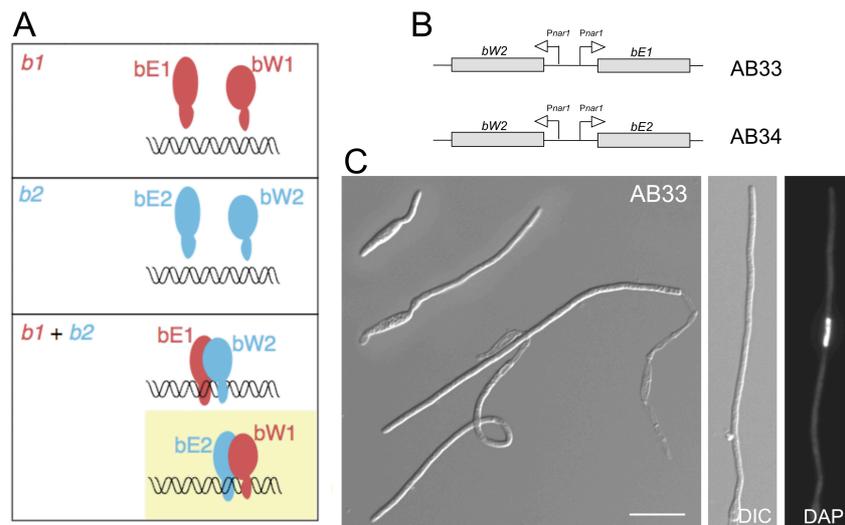


Fig. 9. Inducción del filamento infectivo en estirpes haploides. **A.** Esquema de la formación del heterodímero b, cuyas subunidades son aportadas por cada célula cuando son compatibles en su locus b. **B.** Esquema de los locus b en las estirpes de laboratorio AB33 (b activo) y AB34 (b inactivo). **C.** Las células derivadas de AB33 producen filamentos infectivos tras la incubación en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno. Estas células son haploides y uninucleares. La barra de tamaño son 17 μm .

Construimos una estirpe en un fondo genético AB33 que llevase el alelo *tor1^{lox}*, así como el transgén que expresaba la recombinasa Cre-RE. Un cultivo de esta estirpe resultante crecida después de 6 horas en presencia de medio inductor (MMNO₃ para activar *P_{nar1}* y 4-OHT para activar Cre-RE), presentaba una mezcla de células con núcleos fluorescentes verdes, las cuales correspondían a células que habían escindido el gen *tor1*, y células sin núcleos fluorescentes, que eran células que aún mantenían el gen y por lo tanto del tipo silvestre con respecto a *tor1* (Fig. 10A). Interesantemente, encontramos un grado de correlación significativo entre la presencia de núcleos fluorescentes y la incapacidad para formar filamentos infectivos alargados: Las células que no presentaban fluorescencia nuclear alcanzaron una media de $61,08 \pm 16,7 \mu\text{m}$ de longitud en sus filamentos (una estirpe control, AB33, alcanza una media de alrededor de $60 \mu\text{m}$ tras 6 horas de inducción) frente a una media de $21,4 \pm 13,6 \mu\text{m}$ en las células que mostraban fluorescencia nuclear (Fig. 10B). Estos resultados sugerían fuertemente que Tor1 era necesario para el crecimiento óptimo del filamento infectivo.

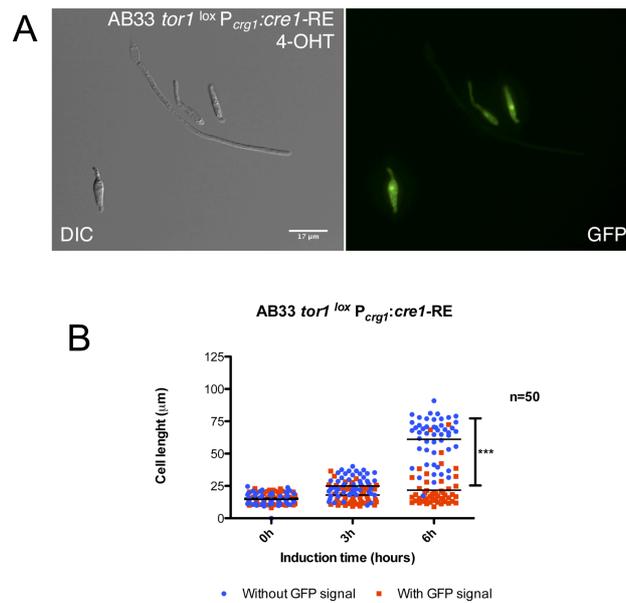


Fig. 10. Tor1 es necesario para una correcta formación del filamento infectivo. A. Fotografía de un cultivo de la estirpe AUM103, que lleva el alelo *tor1^{lox}* y el transgen expresando la recombinasa Cre-RE tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato y presencia de 1 μ M 4-OHT. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos dependiendo de si muestran o no señal de fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación.

La posibilidad de eliminar el gen *tor1* a voluntad de una manera eficiente nos permitió plantear una alternativa al experimento anterior, que pretendía contestar a la pregunta acerca de si la actividad Tor1 era requerida solo para el inicio de la formación del filamento, cuando el programa transcripcional dependiente de *b* se estaba empezando a ejecutar, o era requerida también en pasos posteriores. Para contestar esta cuestión hicimos el mismo experimento de ablación genética del gen *tor1* usando el sistema Cre-Lox pero en este caso usamos una variante de Cre que no requería 4-OHT para ser activa y además su expresión estaba bajo el control del promotor del gen *dik6*, el cual únicamente se expresa una vez que el programa *b* está activo (Brachmann et al., 2001). De este modo la escisión del gen ocurriría una vez que el programa de filamentación estaba iniciado. Los resultados observados fueron similares a los obtenidos en el caso anterior, con un claro impedimento en las células que perdían el gen *tor1* para formar un filamento infectivo alargado (el tamaño medio tras 8 horas de incubación de las células sin fluorescencia fue de $88.1 \pm$

15.4 μm , mientras que en las células con fluorescencia fue de $30,1 \pm 21,0 \mu\text{m}$ (Fig. 11).

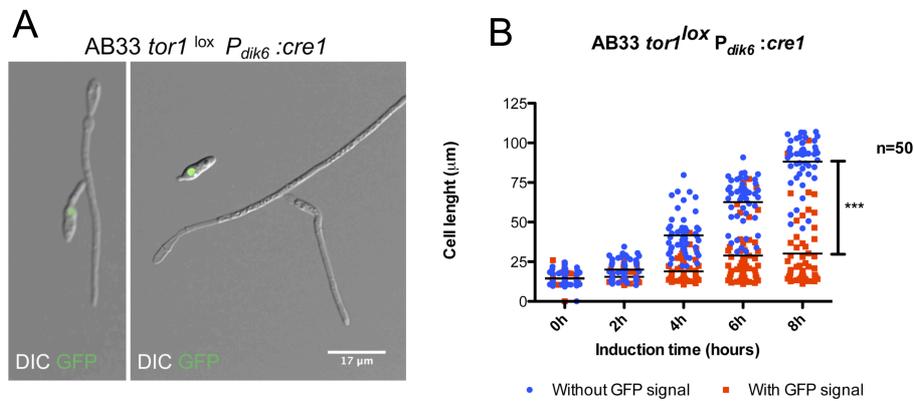


Fig. 11. Tor1 es necesario para una correcta formación del filamento infeccioso incluso una vez activado el programa transcripcional dependiente de b. **A.** Fotografía de un cultivo de la estirpe AUM94, que lleva el alelo *tor1^{lox}* y el transgén expresando la recombinasa Cre bajo el control de *P_{dik6}* tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infecciosos dependiendo de si muestran o no señal de fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación.

Dado que disponíamos de una manera alternativa de inhibir la actividad Tor1 mediante el uso de Rapamicina o Torin1, incubamos la estirpe AB33 en presencia de Torin1 (10 μM) o Rapamicina (1 $\mu\text{g/ml}$) desde el momento en que las células fueron puestas en medio inductor (MMNO₃).

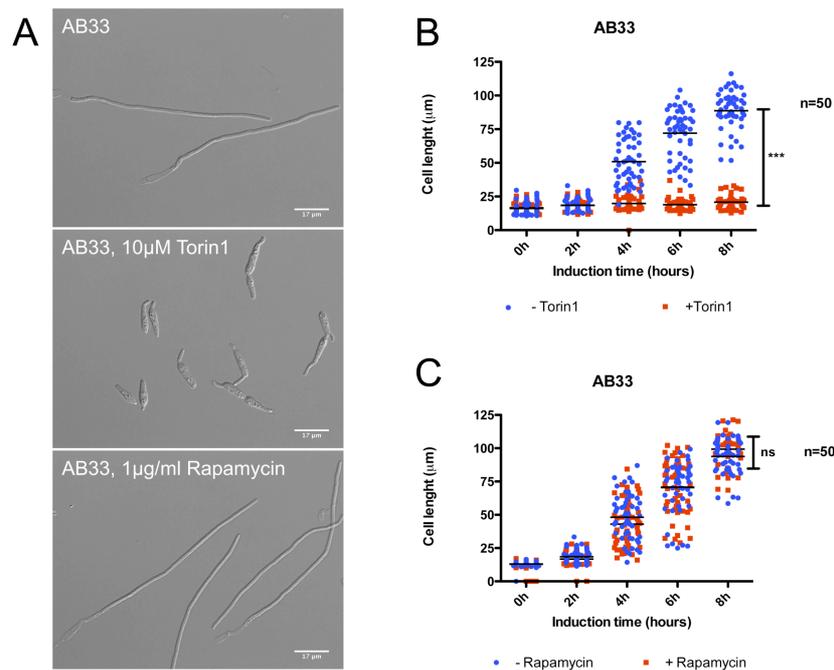


Fig. 12. Inhibición química de TOR durante la formación del filamento infeccioso. A. Fotografía de un cultivo de la estirpe AB33 tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato y las drogas indicadas. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infecciosos en presencia de Torin1 10μM. **C.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infecciosos en presencia de Rapamicina 1μg/ml.

Tras 8 horas de inducción en estas condiciones (Fig. 12A), observamos que la formación del filamento infeccioso se vio fuertemente comprometida en las células tratadas con Torin1 (condiciones control, $81,1 \pm 20,4$ μm frente al tratamiento con Torin1, $21,9 \pm 5,2$ μm, Fig. 12B). En el tratamiento con Rapamicina, sin embargo, los filamentos que se obtuvieron fueron prácticamente indistinguibles de los filamentos con el tratamiento control (condiciones control, $94,2 \pm 12,9$ μm frente al tratamiento con Rapamicina, $94,3 \pm 18,6$ μm Fig. 12C).

El fuerte efecto observado con Torin1 nos permitió realizar un experimento para descartar la posibilidad de que el filamento infeccioso no se produjese debido a algún problema en la expresión del programa transcripcional dependiente del complejo *b*. Para ello, simplemente tratamos con la droga Torin1 una estirpe derivada de AB33 que lleva insertada una construcción en la que se ha fusionado el promotor del gen *dik6* a NLS-GFP, la cual permite seguir si el programa *b* se activa o no observando la presencia en un cultivo de

células con núcleos con fluorescencia verde, ya que el gen *dik6* solo se expresa una vez que el programa transcripcional dependiente de b esta activo (Fig. 13A).

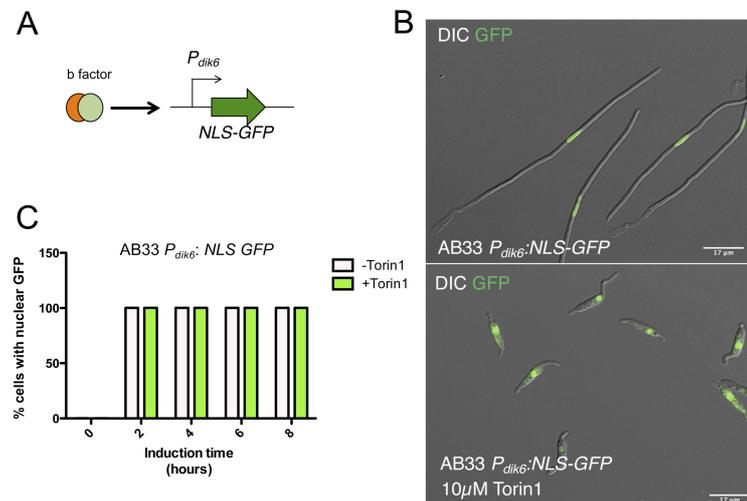


Fig. 13. Torin1 no inhibe el programa transcripcional dependiente de b. **A.** Esquema del sistema reportero para medir actividad del complejo b. **B.** Fotografía de un cultivo de la estirpe UMP121 tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato con y sin adición de 10 μ M Torin1. **C.** Cuantificación de las células mostrando fluorescencia nuclear en función del tiempo. Se analizaron 50 células en cada cultivo, y se muestra la media de dos experimentos independientes.

Tanto las células tratadas con 10 μ M Torin1 como las células con el tratamiento control, mostraron la presencia de núcleos fluorescente con un patrón similar (Fig. 13C), independientemente de que formasen o no filamento infectivo (Fig. 13B). Por lo tanto, a partir de todos estos resultados anteriores, concluimos que la actividad de la kinasa Tor1 era necesaria para la formación del filamento infectivo, incluso una vez que el proceso ya estaba activado. Sin embargo, esta kinasa no parecía necesaria para la activación del programa de transcripción asociado a dicha producción del filamento infectivo.

La actividad TORC1 es requerida para la formación el filamento infectivo en *U. maydis*.

La kinasa Tor1 puede formar parte de dos complejos, TORC1 y TORC2, que tienen funciones diferentes, dependiendo del organismo en cuestión (Tatebe and Shiozaki, 2017). Ambos complejos están altamente conservados en todos

los organismos eucariotas y se diferencian en sus proteínas accesorias. Así, el complejo TORC1 esta formado por la kinasa Tor1 y las proteínas accesorias Raptor y Lst8 mientras que el complejo TORC2 esta compuesto por la kinasa Tor1 y las proteínas accesorias Rictor, Sin1 y Lst8 (Tatebe and Shiozaki, 2017). Como ya se comento anteriormente, Rapamicina solo afecta al complejo TORC1, dado que en el caso de TORC2 la proteína Rictor enmascara el dominio donde el complejo FKBP12 y Rapamicina interaccionan con Tor1. El resultado anterior en el que Torin1 inhibe fuertemente la producción del filamento infectivo, mientras Rapamicina no tiene ningún efecto apreciable, podría estar indicando que solo el complejo TORC2 estaba implicado en la formación del filamento infectivo en *U. maydis*. Alternativamente, también podría ser que se requiera un nivel de inhibición muy elevado de la actividad TOR para afectar la formación del filamento infectivo, y que el tratamiento con Rapamicina no fuera suficiente. Para determinar cual era la respuesta correcta, decidimos mediante un abordaje genético eliminar específicamente uno u otro complejo y evaluar su efecto en la formación del filamento infectivo.

Sabíamos que Tor1 era esencial para el crecimiento, pero no podíamos adscribir esta esencialidad a alguno de los dos posibles complejos. Por ello, nuestra aproximación inicial consistió en construir estirpes condicionales en los genes que codificaban a las proteínas de andamio de cada complejo, Raptor (*rpt1*) en el caso de TORC1 y Rictor (*rct1*) y Sin1 (*sin1*) en el caso de TORC2.

En principio usamos un abordaje de intercambio del promotor nativo por el promotor *Pnar1*, similar al descrito más arriba para *tor1*. En el caso de las proteínas reguladoras de TORC2, Rict1 y Sin1 (Fig. 14A), encontramos que el apagado de los genes que las codifican (analizado mediante RT-PCR, Fig. 14D, E) no tuvo ningún efecto aparente en la capacidad para formar colonias en medio sólido represor (Fig. 14B) o en la morfología de las células en cultivos líquidos (Fig. 14C).

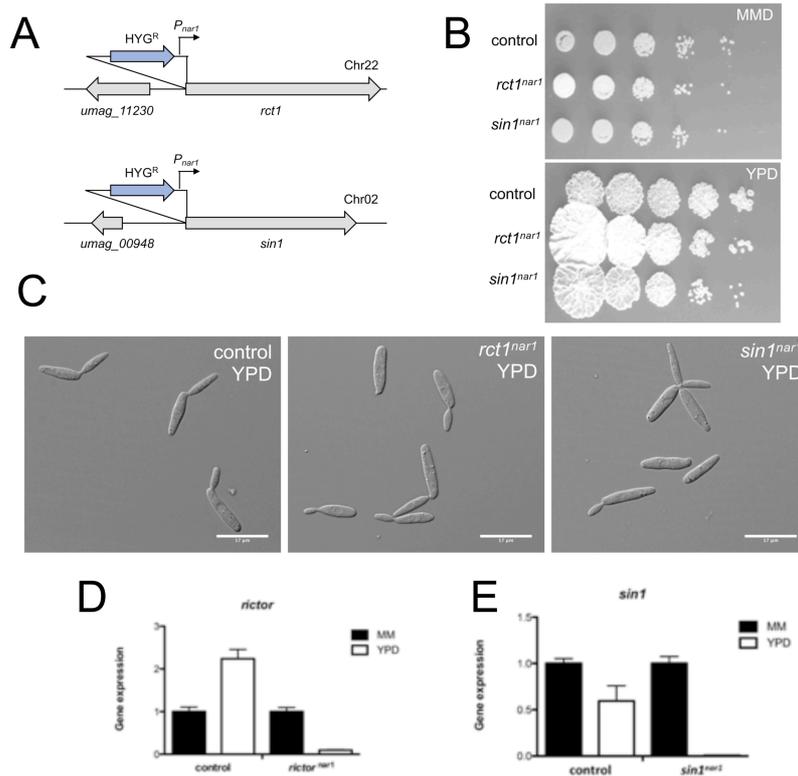


Fig. 14. Expresión condicional de TORC2. **A.** Esquema de los alelos *rct1^{nar1}* y *sin1^{nar1}*. El promotor endógeno fue intercambiado con el promotor *P_{nar1}* asociado a una resistencia a Higromicina. **B.** Crecimiento en medio sólido permisivo (MMD) y represor (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, FB1, *rct1^{nar1}* AUM8, *sin1^{nar1}*, AUM16) tras una incubación de 2 días a 28°C. **C.** Aspecto de las células en medio rico (YPD) tras una incubación de 8 horas a 28°C. **D y E.** RT-PCR cuantitativa de los genes *rct1* y *sin1* en las estirpes y medios indicados. El ARN se aisló después de 8 horas de incubación a 28°C. Como control interno, se usó la expresión de *tub1* (que codifica Tubulina α). Se tomó como valor de referencia la expresión de la estirpe silvestre en condiciones control (YPD). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes.

Esta aparente falta de efecto en la proliferación y morfología observada era atribuible a la no esencialidad de estos genes: pudimos obtener los correspondientes mutantes que llevaban alelos de delección de toda la pauta de lectura abierta y el único efecto que observamos de la falta de actividad TORC2 con respecto al crecimiento fue un ligero aumento de la longitud celular en algunas células mutantes así como una muy ligera disminución en la capacidad de crecimiento en medio sólido YPD) (Fig. 15).

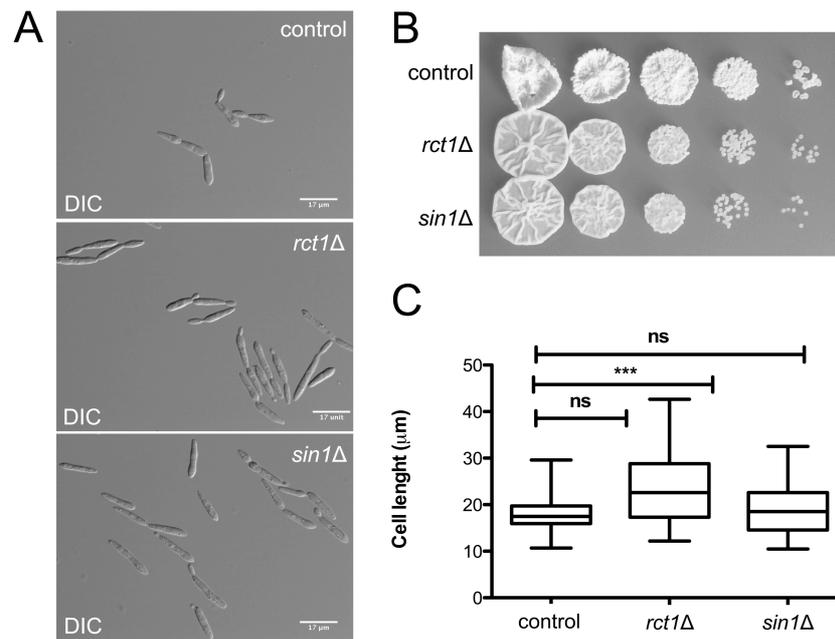


Fig.15. La falta de función de TORC2 apenas afecta el crecimiento en *U. maydis*. **A.** Aspecto de las células en medio rico (YPD) tras una incubación de 8 horas a 28°C. **B.** Crecimiento en medio sólido (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, FB1, *rct1Δ* AUM89, *sin1 Δ* AUM97) tras una incubación de 2 días a 28°C. **C.** Cuantificación del tamaño medio celular de las estirpes indicadas, crecidas en medio líquido YPD.

Cuando dichos alelos de delección se introdujeron en el fondo genético AB33 y comprobamos su capacidad para hacer filamentos una vez inducida la producción del complejo b, encontramos que la actividad asociada a TORC2 no parecía ser necesaria para la formación del filamento infectivo (Fig. 16A). Al contrario, parecía incluso que los filamentos de las células mutantes en TORC2, eran ligeramente más largos (control $86,76 \pm 18,09 \mu\text{m}$, *rct1Δ* $114,90 \pm 13,78 \mu\text{m}$, *sin1Δ* $115,32 \pm 17,24 \mu\text{m}$, Fig. 16B).

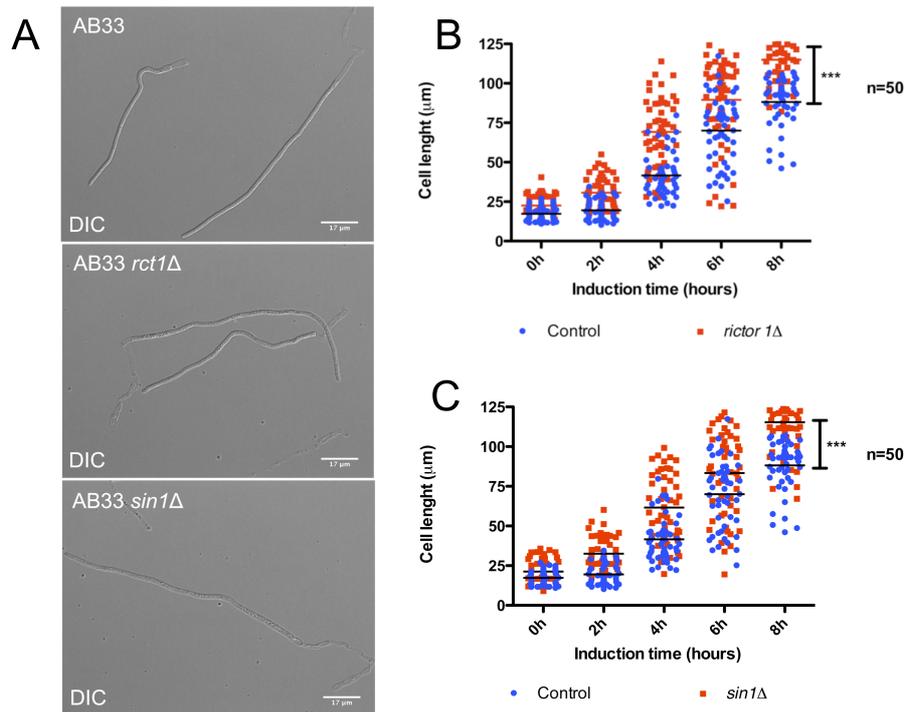


Fig. 16. TORC2 no es necesario para la formación del filamento infectivo. **A.** Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. **B y C.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

Para determinar la posible implicación del complejo TORC1, se construyó inicialmente una estirpe de expresión condicional para el gen *rpt1* (Fig. 17A). El gen *rpt1* sí parecía ser esencial en *U. maydis*, ya que una estirpe que portaba el alelo condicional *rpt1^{nar1}* presentaba un crecimiento muy atenuado en medio sólido represor (Fig. 17B) Además, el fenotipo mostrado por las células condicionales cuando se reprimía la expresión de *rpt1* era un fenotipo similar al observado anteriormente en la estirpe condicional para *tor1* (Fig. 17C). Un análisis de RT-PCR nos indicó que al igual que en el caso del alelo *tor1^{nar1}* existía una transcripción rezumante (Fig. 17D).

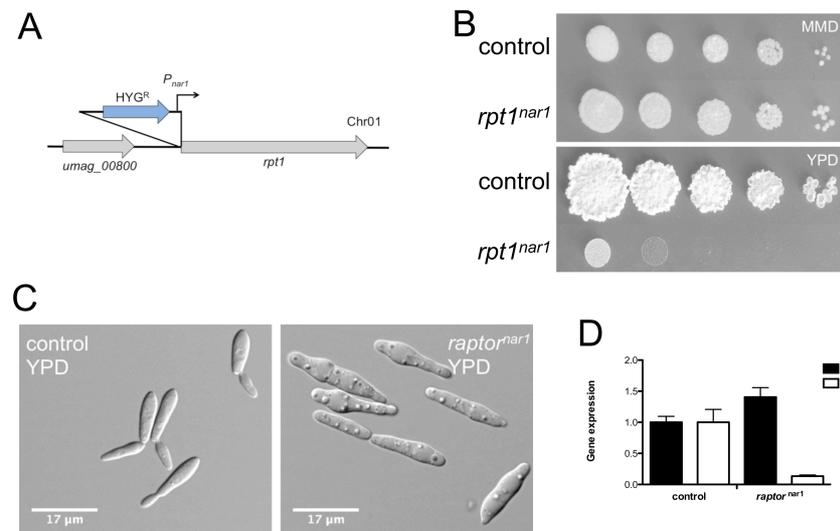


Fig. 17. Expresión condicional de TORC1. **A.** Esquema del alelo *rpt1^{nar1}*. El promotor endógeno fue intercambiado con el promotor P_{nar1} asociado a una resistencia a Higromicina. **B.** Crecimiento en medio sólido permisivo (MMD) y represor (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, FB1, *rct1^{nar1}* AUM8, *sin1^{nar1}* AUM16) tras una incubación de 2 días a 28°C. **C.** Aspecto de las células en medio rico (YPD) tras una incubación de 8 horas a 28°C. **D.** RT-PCR cuantitativa del gen *rpt1* y en las estirpes y medios indicados. El ARN se aisló después de 8 horas de incubación a 28°C. Como control interno, se usó la expresión de *tub1* (que codifica Tubulina α). Se tomó como valor de referencia la expresión de la estirpe silvestre en condiciones control (YPD). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes.

Decidimos construir un alelo de *rpt1* flanqueado por sitios *lox* para que pudiese ser eliminado mediante la acción de la proteína Cre-RE en respuesta a la adición de 4-OHT (Fig. 18A).

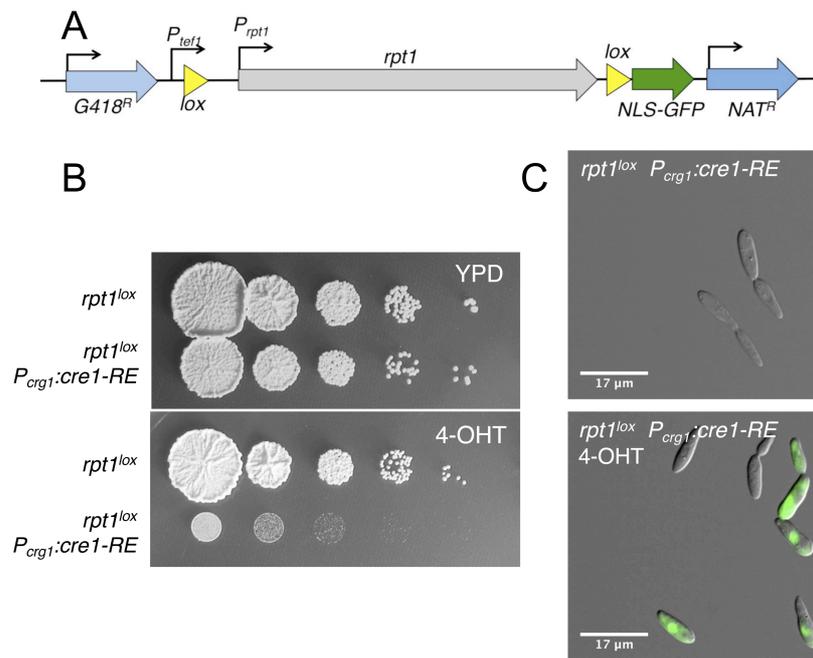


Fig. 18. Ablación genética de TORC1. **A.** Esquema del locus $rpt1^{lox}$. **B.** Crecimiento en medio sólido en condiciones de no activación de la recombinasa Cre-RE (YPD) y activación (1 μ M 4-OHT) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (AUM87 $rpt1^{lox}$ y AUM104 $rpt1^{lox} P_{crg1:cre1-RE}$) tras una incubación de 2 días a 28°C. **C.** Aspecto de las células en condiciones de no inducción (YPD) e inducción (1 μ M 4-OHT) tras una incubación de 6 horas a 28°C.

Al igual que observamos con el alelo $tor1^{lox}$, la incubación de las células $rpt1^{lox}$ que llevaban la construcción con la recombinasa Cre-RE con 4-OHT 1 μ M, resultó en una afectación de la proliferación en medio sólido y la aparición de células con núcleos fluorescentes en medios líquidos (Figs. 18 B, C).

Introdujimos el sistema condicional en un fondo genético AB33 y se analizó si el gen $rpt1$ era requerido para la formación del filamento infectivo. Como se aprecia en la Fig. 19A, las células que presentaban señal fluorescente en el núcleo (células sin el gen $rpt1$) estaban afectadas en la capacidad para la formación del filamento infectivo, mientras que las células carentes de señal GFP nuclear se comportaron de una forma similar a la estirpe silvestre (el tamaño medio tras 8 horas de incubación de las células sin fluorescencia fue de $88.15 \pm 14,3 \mu\text{m}$, mientras que en las células con fluorescencia fue de $32,9 \pm 12,5 \mu\text{m}$) (Fig19B). Estos datos fuertemente sugerían que la actividad

TORC1 era la actividad TOR requerida para la formación del filamento infeccioso.

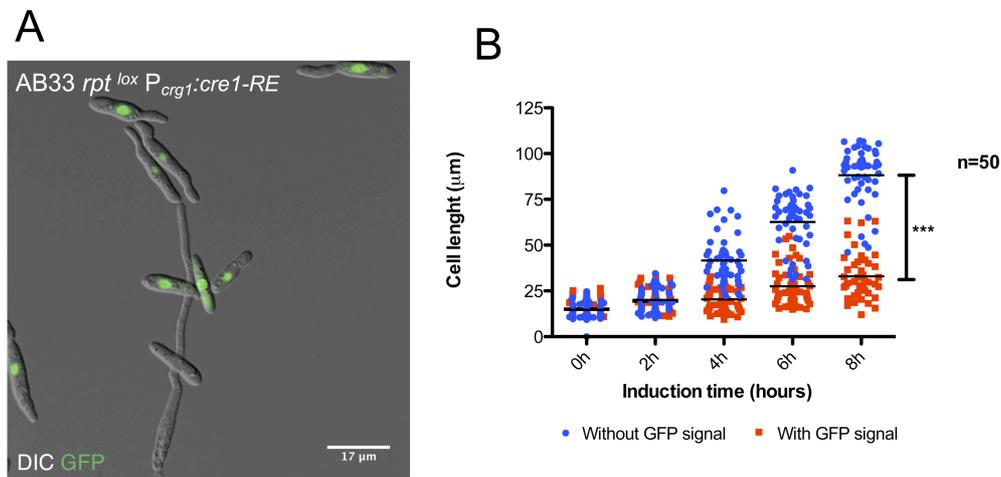


Fig. 19. TORC1 es necesario para una correcta formación del filamento infeccioso. A. Fotografía de un cultivo de la estirpe AUM104, que lleva el alelo *rpt1^{lox}* y el transgen expresando la recombinasa Cre-RE tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato y presencia de 1 µM 4-OHT. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infecciosos dependiendo de si muestran o no señal de fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación.

Los sustratos de TORC1, Sch9 y Aga1 (S6 kinasas) son necesarios para una correcta filamentación dependiente del complejo b.

El complejo TORC1 actúa a diferentes niveles, fosforilando directamente sustratos importantes para su función o activando, vía fosforilación, a kinasas intermedias que amplifican la señal inicial. Algunas de estas kinasas constituyen la familia de las S6 kinasas (S6K). En *S. cerevisiae* existen 3 proteínas S6K: Sch9, Ypk1 e Ypk2 siendo reguladas por TORC1 la primera y TORC2 las dos últimas (Kamada et al., 2005; Urban et al., 2007; Niles et al., 2012). En el caso de *S. pombe* existen 4 proteínas S6K de las cuales Sck1, Sck2 y Psk1 son reguladas por el complejo TORC1 (Otsubo et al., 2017) mientras que la cuarta denominada Gad8 está controlada por el complejo TORC2 (Du et al., 2012) (Fig. 20A). Una búsqueda bioinformática a través de BLASTp usando las S6K de *S. cerevisiae* y *S. pombe* como secuencia molde, indicó que en *U. maydis* existían únicamente 2 proteínas de la familia S6K: umag_00602, homóloga a Sch9 (TORC1) y umag_10123, que parecía

homóloga a Gad8 (TORC2) (Fig. 20B). Esta última kinasa ya había sido descrita previamente como Aga1, no era esencial y además su falta de función no parecía afectar la capacidad para formar filamento el infectivo en una estirpe solopatógena, aunque sí era necesaria para infectar la planta de maíz (Berndt et al., 2010).

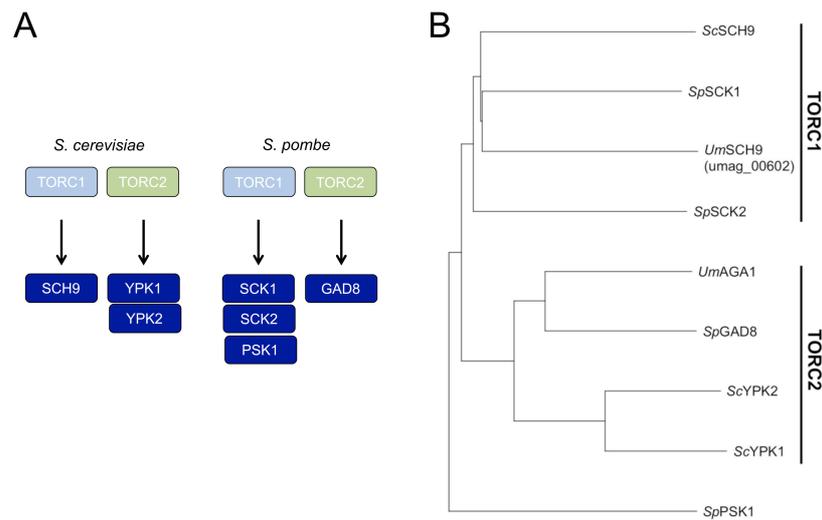


Fig. 20. S6 kinasas en *U. maydis*. **A.** Esquema mostrando las distintas S6K de levaduras de gemación y fisión. **B.** Dendrograma de las posibles S6K de *U. maydis* junto con las de *S. pombe* y *S. cerevisiae*.

Decidimos deletar el gen que codificaba umag_00602, que nombramos como *sch9*, así como el gen *aga1* en un fondo genético AB33. También construimos los mutantes dobles. Observamos que la ausencia de tanto Sch9, Aga1 o ambas no parecía ser esencial, aunque afectaba al crecimiento de las respectivas estirpes en medios sólidos (Fig. 21A).

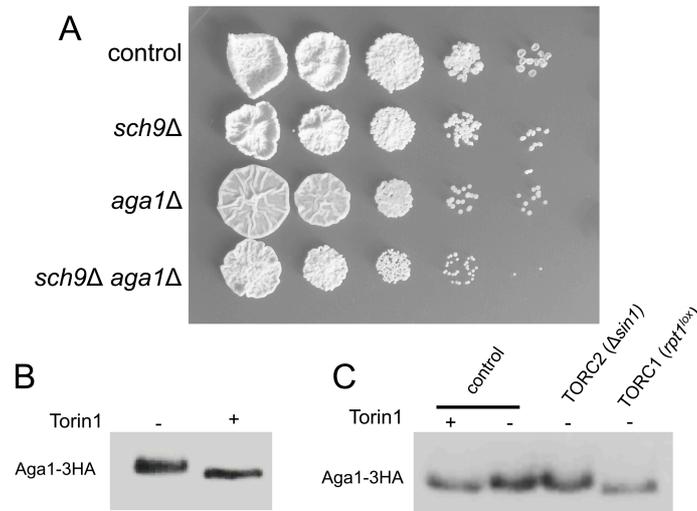


Fig. 21. Aga1 es parte de la ruta TORC1. **A.** Crecimiento en medio sólido (YPD) de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, FB1, *sch9Δ* AUM98, *aga1Δ* AUM39, *sch9Δ aga1Δ* AUM110) tras una incubación de 2 días a 28°C. **B.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de un alelo de Aga1 marcado con el epítipo 3HA, tras un tratamiento de las células con 10μM de Torin1. **C.** Movilidad electroforética de Aga1-3HA en distintos mutantes de TORC1 y TORC2.

También quisimos apoyar la idea de que estas proteínas estaban controladas por alguno de los complejos TOR en *U. maydis*. En las levaduras de gemación y fisión se han observado cambios en el patrón de movilidad de las proteínas S6K en geles de acrilamida debido a su diferente patrón de fosforilación por los complejos TORC1 o TORC2 (Urban et al., 2007; Otsubo et al., 2017). Nosotros fusionamos el epítipo HA en el extremo amino-terminal de Sch9 y carboxilo-terminal de Aga1 (no encontramos pérdida de función en los alelos mutantes) con el fin de analizar si existía algún cambio en el patrón de movilidad de las proteínas en geles de acrilamida tras llevar a cabo un tratamiento con Torin1. Mientras que con la proteína Sch9, (y tras un buen número de intentos con distintas condiciones de separación, incluido geles con PhosTag) no se observó ningún cambio de movilidad tras el tratamiento con Torin1, en el caso de Aga1 sí fue apreciable un cambio en su movilidad electroforética tras el tratamiento de las células con Torin1, que parecía compatible con una supuesta fosforilación por parte de Tor1 (Fig. 21B). Para poder discernir si Aga1 era diana de TORC1 o TORC2, introdujimos el alelo marcado con HA en fondos carentes de *sin1* para el caso del complejo TORC2 y ablación genética de *rpt1* para el caso del complejo TORC1. Sorprendentemente, a pesar de que

por similitud de secuencia Aga1 pertenece al grupo de S6K activadas por el complejo TORC2, observamos que Aga1 en *U. maydis* migraba más rápido en el mutante *rpt1Δ*, coincidiendo con la migración mostrada en la estirpe tratada con Torin1. Por otro lado, en el mutante *sin1Δ* la proteína migraba más lentamente, coincidiendo con la movilidad mostrada por la estirpe control en condiciones de no tratamiento con Torin1 (Fig. 21C). Estos datos apoyaban la idea de que la proteína Aga1 en *U. maydis* era parte de la ruta TORC1. También asumimos que Sch9 era parte de la ruta TORC1. En este caso nos basamos en los ligeros defectos en proliferación observados en medios sólidos que parecían potenciarse en el doble mutante *sch9* y *aga1*.

Eliminamos los respectivos genes (solos y en combinación) en un fondo genético que expresaba el complejo b (AB33) y analizamos su capacidad para formar el filamento infectivo. Reforzando la idea de que ambas S6 kinasas estaban aguas abajo de TORC1, encontramos que la pérdida de función individual de cada una de estas kinasas afectaba muy ligeramente a la capacidad de las células para formar el filamento infectivo (control $86,16 \pm 17,03 \mu\text{m}$, *sch9Δ* $74,05 \pm 13,75 \mu\text{m}$, *aga1Δ* $100,97 \pm 25,41 \mu\text{m}$), pero que, sin embargo, el filamento infectivo sí fue claramente afectado cuando ambas S6K (Sch9 y Aga1) fueron inactivadas (control $86,16 \pm 17,03 \mu\text{m}$, *sch9Δ aga1Δ* $47,23 \pm 14,66 \mu\text{m}$ Fig. 22A, B)

En resumen, todos los resultados anteriores indicaban que el crecimiento del filamento infectivo en *U. maydis*, dependía de la actividad del complejo TORC1, y que esta actividad se transmitía al menos mediante dos S6 kinasas, Sch9 y Aga1. Lo más probable es que estas kinasas tengan, aguas abajo, la capacidad para regular procesos anabólicos tales como la síntesis de proteínas y mediante ello promocionen el crecimiento del filamento.

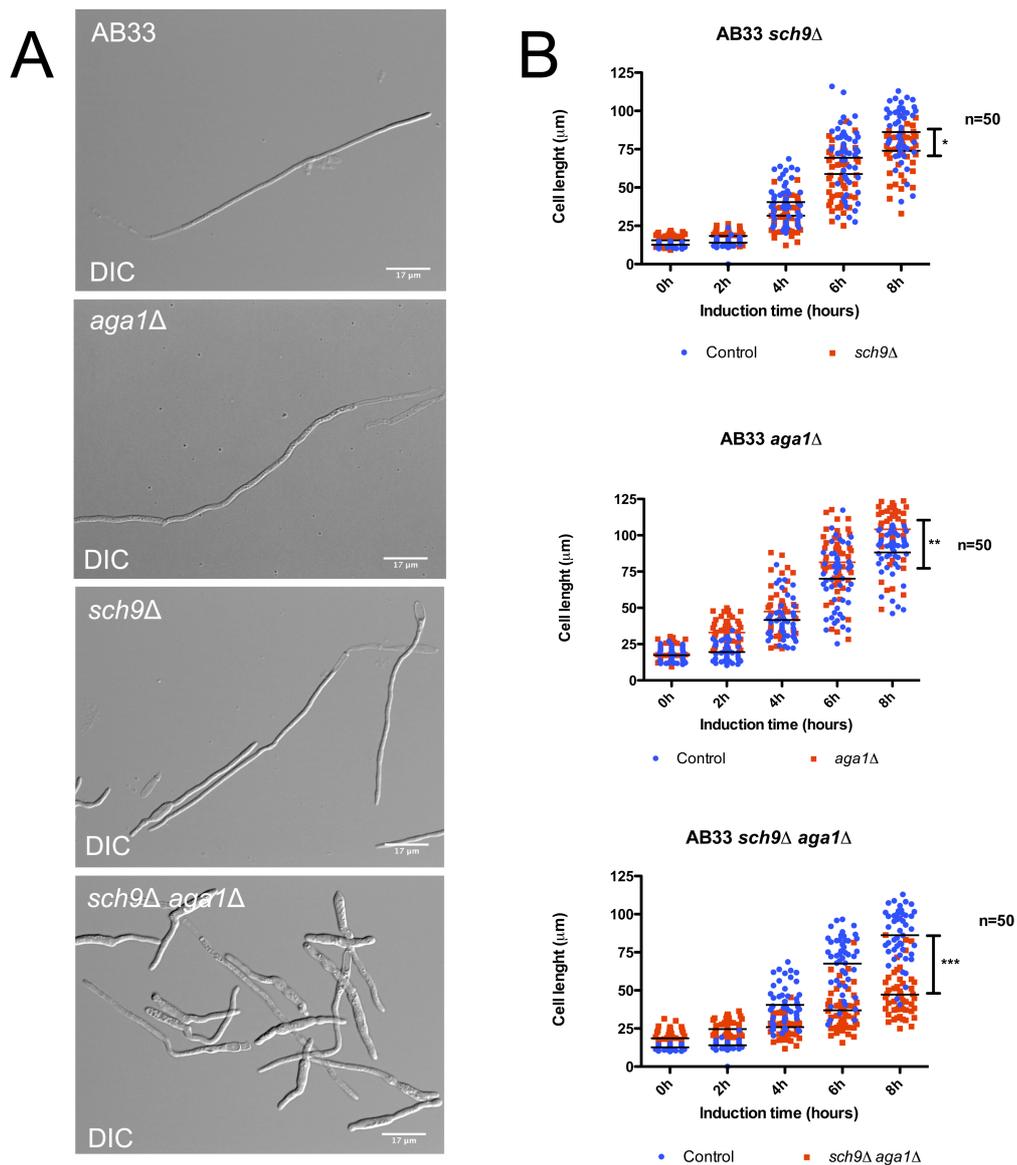


Fig. 22. Las S6K de *U. maydis* son necesarias para la formación del filamento infeccionoso.
A. Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infeccionosos de las estirpes indicadas.

TORC1 responde a condiciones nutricionales en *U. maydis*.

La ruta TORC1 es el componente central de una red de señalización que acopla un gran rango de estímulos tanto externos como internos con la capacidad de la célula para crecer y modificar su metabolismo. Uno de los estímulos más importantes para un organismo eucariota unicelular como es el caso de *U. maydis* es la presencia de nutrientes. Otras levaduras como *S.cerevisiae* o *S. pombe* responden a las condiciones nutricionales modulando

los niveles de actividad del complejo TORC1 (Wei et al., 2009). Dado que la actividad TORC1 parece ser importante para la formación del filamento infectivo en *U. maydis*, y que las condiciones nutricionales son importantes para la activación del programa de virulencia en este hongo (Hartmann et al., 1999), decidimos profundizar un poco en la relación entre estos factores.

Una manera sencilla de determinar el grado de actividad del complejo TORC1 es analizar el nivel de fosforilación mediada por S6 kinasas de la proteína ribosomal Rps6. Aunque es una medida indirecta (TORC1 activa a las S6 kinasas y estas fosforilan Rps6), el grado de conservación de los residuos fosforilados (correspondiente a Ser235 y Ser236 en *Homo sapiens* Rps6) y la disponibilidad de anticuerpos comerciales frente a la fosforilación de dichos residuos han convertido este abordaje en uno de los más usados. Nosotros, sin embargo, no usamos esta aproximación. A pesar de que este sitio de fosforilación está muy conservado en otros hongos, no lo estaba en *U. maydis* (Fig. 23). Además, resultados recientes han indicado que Rps6 puede ser también diana de TORC2 en algunos organismos (Du et al., 2012; Yerlikaya et al., 2016).

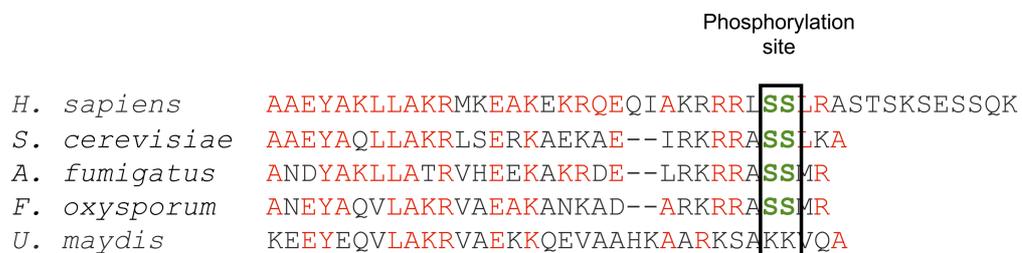


Fig. 23. Rps6 en *U. maydis*. Alineamiento de secuencia de la proteína Rps6 de las especies fúngicas indicadas con su homólogo de humanos, alrededor del sitio de fosforilación por S6K en humanos.

Por ello, buscamos alternativas para poder determinar si la actividad de TORC1 se modificaba por las condiciones nutricionales. El cambio de movilidad de Aga1 en respuesta a la actividad TORC1 era una buena aproximación, pero necesitábamos también alguna medida de la actividad de Sch9. Una alternativa que consideramos fue la proteína Maf1, un represor global de genes transcritos

por RNAPIII, es una diana de TORC1 vía fosforilación mediada por Sch9 o sus homólogos funcionales, tanto en mamíferos como en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Du et al., 2012; Otsubo et al., 2017). Realizamos una búsqueda de Maf1 en *U. maydis* por similitud de secuencia vía BLASTp, empleando como secuencia de referencia la proteína Maf1 de *S. pombe* y se obtuvo como posible proteína homóloga (umag_11056, a partir de ahora Maf1) (Fig. 24A). Dicha proteína fue marcada con el epítoto HA en su extremo N-terminal y observamos que presentaba un cambio en el patrón de movilidad en geles de acrilamida entre células tratadas o no con la droga Torin1, que parecía coherente con una fosforilación mediada por Tor1 (Fig.24B). Determinamos además que este cambio en el patrón de movilidad dependía de Sch9 y no dependía de Sin1 (esto es, no era una diana de TORC2).

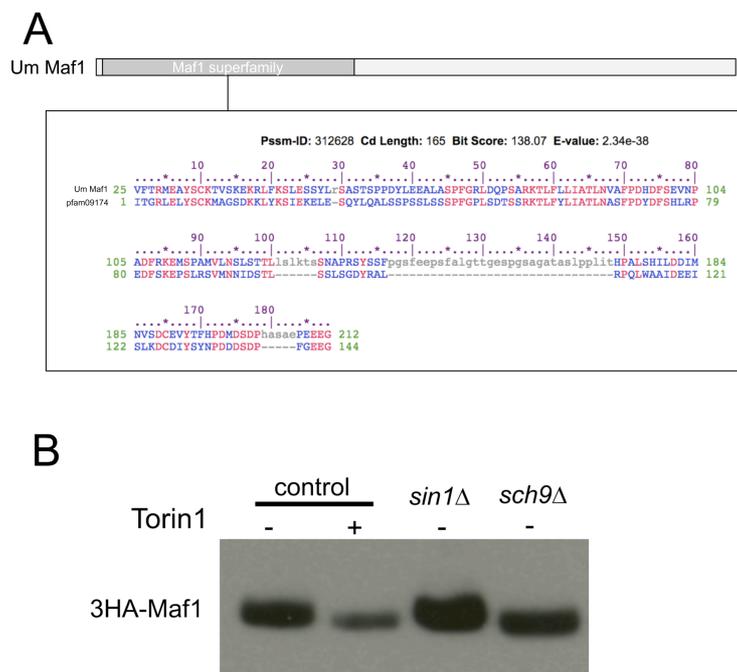


Fig. 24. Maf1 es una diana de TORC1 en *U. maydis*. **A.** Esquema de la proteína Maf1 de *U. maydis* donde se muestra un alineamiento con el dominio pfam 09174, que define a la superfamilia de proteínas Maf. **B.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de un alelo de Maf1 marcado con el epítoto 3HA, a partir de extracto celulares obtenidos tras un tratamiento de las células con 10μM de Torin1 así como de células mutantes en TORC1 (*sch9*Δ) y TORC2 (*sin1*Δ).

Estos datos apoyaban la idea de que Maf1 en *U. maydis* también estaba controlada por TORC1.

Analizamos el patrón de movilidad electroforética tanto de Maf1 como de Aga1 en dos condiciones nutricionales: medio rico (YPD) y medio mínimo suplementado con nitrato como fuente de nitrógeno (MMNO₃). Como se aprecia en la Fig. 25, sí pudimos observar un cambio en el patrón de migración electroforética dependiendo del medio nutricional, que era coherente con un mayor grado de actividad TORC1 en medio rico frente a medio mínimo suplementado con nitrato.

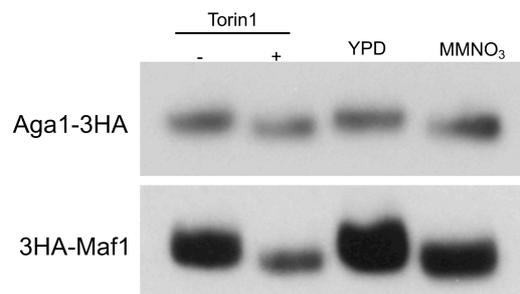


Fig. 25. TORC1 responde a las condiciones nutricionales. Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de alelos de Maf1 y Aga1 marcados con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares crecidos en medio rico (YPD) y medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno (MMNO₃). Como control de movilidad se incluyó extractos celulares de una estirpe crecida en medio rico (YPD) con y sin adición de Torin1 10 μ M.

La actividad TORC1 parece mantenerse elevada durante la formación del filamento infectivo.

La extremada sensibilidad de la actividad TORC1, medida mediante el cambio de movilidad electroforética de Maf1 y Aga1, frente a los diferentes medios de cultivo nos planteó la siguiente paradoja: Se había determinado que TORC1 era necesario para mantener la filamentación cuando se inducía el complejo b en nuestro modelo de trabajo, AB33, lo que ocurría cuando se crecían las células en MMNO₃. Sin embargo, también habíamos determinado que aparentemente en ese mismo medio, la actividad TORC1 parecía muy baja, a juzgar por la alta movilidad electroforética de las proteínas Maf1 y Aga1.

Para entender esta aparente discrepancia, se analizó el nivel de actividad TORC1 durante la formación del filamento infectivo, usando el cambio en la movilidad electroforética tanto de Maf1 como de Aga1 como sistema reportero.

Como control utilizamos un fondo genético AB34, que no produce un complejo b activo y por lo tanto no resulta en la formación de un filamento infectivo. De esta manera podíamos diferenciar si las diferencias de movilidad electroforética eran debidas al cambio en las condiciones nutricionales (células crecidas en medio rico que a tiempo 0 son transferidas a medio mínimo con nitrato) o a la presencia de un heterodímero b activo.

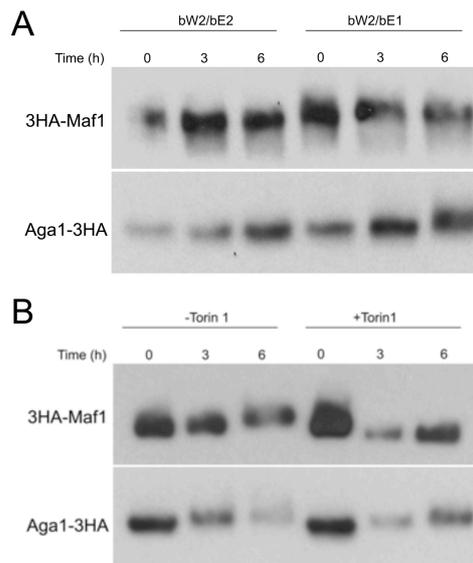


Fig. 26. TORC1 parece mantenerse activo de una manera b-dependiente. A. Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de alelos de Maf1 y Aga1 marcados con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b no activo (bW2/bE2, AUM63 y AUM33) o activo (bW2/bE1, AUM210 y AUM30) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado. **B.** Similar experimento que en A, pero con la adición de Torin1 10µM desde el tiempo 0.

Como se aprecia en la Fig. 26A, tras 6 horas en medio inductor (MMNO₃) en la estirpe control que no produce un heterodímero b activo (bW2/bE2), la movilidad electroforética de Maf1 y Aga1 se hace mayor, probablemente como respuesta a las nuevas condiciones nutricionales. Sin embargo, en la estirpe que produce un heterodímero b activo (bW2/bE1), se observó una menor movilidad electroforética en ambas proteínas. Para confirmar que dicha alteración era dependiente de la actividad TORC1, repetimos el experimento en presencia de Torin1 y observamos que mientras que la movilidad electroforética de Maf1 se volvía elevada (es decir, era dependiente de Tor1), el retraso en la movilidad electroforética de Aga1 se mantenía (era Tor1

independiente) (Fig. 26B).

Estos resultados sugerían que, de alguna manera, en estirpes con un heterodimero b activo la actividad TORC1, al menos la ejercida sobre Maf1, parecía mantenerse a pesar de que las condiciones nutricionales externas eran proclives a una bajada de dicha actividad.

La actividad TORC1 se mantiene elevada durante la formación del filamento infectivo aún en ausencia de asimilación de fuente de nitrógeno.

En los sistemas experimentales que se han estudiado, uno de los estímulos externos que modulan la actividad TORC1 es la calidad de la fuente de nitrógeno. Sorprendentemente, en el caso de *U. maydis*, en presencia de un complejo b activo parecía existir cierta insensibilidad a la fuente de nitrógeno, ya que la actividad TORC1 se mantenía elevada a pesar de que la fuente de nitrógeno era nitrato, condiciones que en estirpes sin un complejo b activo daban como resultado una baja actividad TORC1.

Decidimos probar los límites de esta supuesta insensibilidad analizando la actividad TORC1 en condiciones de ausencia de asimilación de fuente de nitrógeno. Dado que en nuestro modelo de trabajo (estirpes derivadas de AB33), necesitamos la presencia de nitrato para poder inducir la transcripción de los genes que codifican las subunidades del complejo b, decidimos utilizar un fondo mutante capaz de detectar la presencia de nitrato, pero no de metabolizarlo. En *U. maydis*, al igual que en otros sistemas fúngicos, la asimilación de nitrato implica su conversión en nitrito a través de la enzima nitrato reductasa, y este a su vez en una reacción catalizada por la enzima nitrito reductasa en amonio, el cual finalmente es incorporado a esqueletos carbonados del ciclo de Krebs para ser transformado en glutamina (Fig. 27A). Por ello, para evitar la asimilación de nitrato, delecionamos el gen que codifica la enzima nitrato reductasa, *nar1* (Lewis and Fincham, 1970; Banks et al., 1993), en un fondo genético AB33, así como en su control AB34. En estos mutantes comprobamos en primer lugar su incapacidad para crecer en nitrato como única fuente de nitrógeno (Fig. 27B, C). Además, dado que en otros

sistemas fúngicos la detección de nitrato requiere su asimilación (Unkles et al., 2004), también analizamos si las estirpes carentes de nitrato reductasa eran capaces de inducir la transcripción de los genes *b* en presencia de nitrato, como así fue el caso (Fig. 27D).

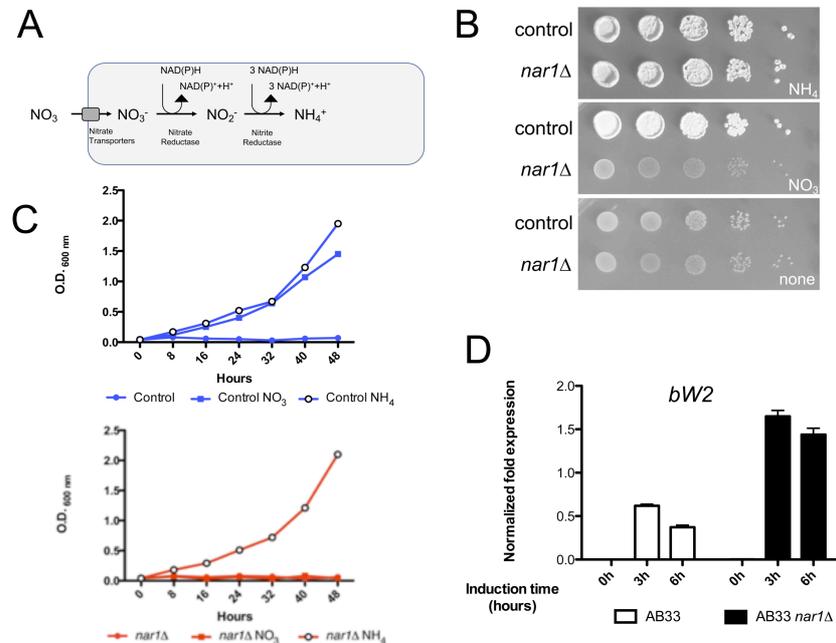


Fig. 27. Estirpes de *U. maydis* capaces de sentir el nitrato, pero no asimilarlo. A. Esquema de la asimilación de nitrato en hongos. **B.** Crecimiento en medio sólido con 50 mM de amonio (NH₄), 50 mM de nitrato (NO₃) o nada (none) como única fuente de nitrógeno de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, AB34, *nar1Δ* AUM193) tras una incubación de 3 días a 28°C. El crecimiento residual fue debido a impurezas en la agarosa usada para las placas (2% final). **C.** Medida del crecimiento mediante el aumento de la turbidez (OD₆₀₀) de los cultivos en medio mínimo sin fuente de nitrógeno (control), 50 mM de amonio (NH₄) o 50 mM de nitrato (NO₃). **D.** RT-PCR cuantitativa para el gen *bw2* en una estirpe control (AB33) y su derivado sin gen *nar1* (AUM194). El ARN se aisló después del tiempo indicado en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno a 28°C. Como control interno, se usó la expresión de *tub1* (que codifica Tubulina α). Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (tiempo 0, AB33). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes.

Cuando analizamos la capacidad de la estirpe mutante en la asimilación de nitrato para producir un filamento infectivo, sorprendentemente observamos que aun era capaz de producirlo (Fig. 28A), aunque el tamaño medio del filamento era mucho menor que el control, capaz de asimilar nitrato (control 103,4±12,69 μ m, *nar1Δ* 53,90±10,31 μ m. Fig. 28B). Analizamos también la

actividad TORC1 en las estirpes incapaces de asimilar nitrato y de un modo coherente a la aparente insensibilidad a la fuente de nitrógeno, observamos que la reducida movilidad electroforética de Maf1 se mantenía (Fig 28C). La movilidad electroforética reducida de Aga1 también se mantenía, aunque ya habíamos descrito que parecía ser independiente de Tor1.

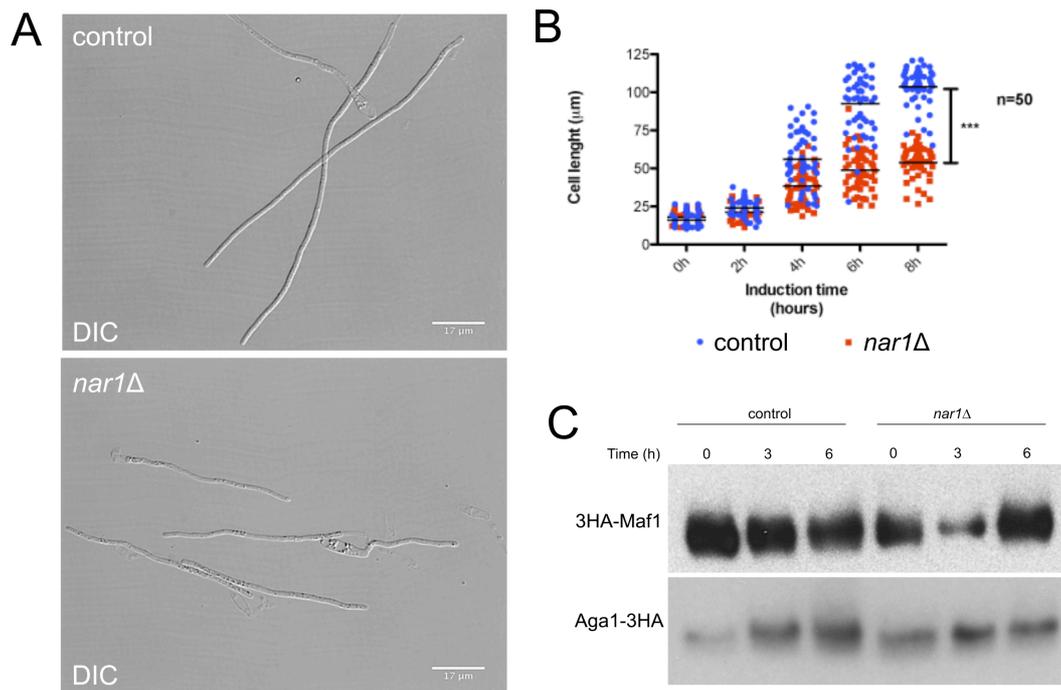


Fig. 28. El filamento infectivo parece ser insensible a la falta de nitrógeno. **A.** Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33, *nar1*Δ AUM194.. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas. **C.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de alelos de Maf1 y Aga1 marcados con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b activo (AUM210, AUM30, AUM194 y AUM196) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado.

TORC1 en *U. maydis* parece estar regulado de una manera similar a la descrita en metazoos.

Los resultados descritos anteriormente, que sugieren que en condiciones de un complejo b activo la actividad TORC1 es capaz de mantenerse alta, incluso en condiciones de falta de asimilación de nitrógeno, podrían explicarse en

principio o bien porque la presencia de un complejo b activo vuelve insensible el complejo TORC1 a la falta de fuente de nitrógeno, o bien porque existe una manera alternativa, dependiente del complejo b, de activar TORC1. Dado el desconocimiento previo de como se controla TORC1 en *U. maydis*, nos planteamos una caracterización superficial de los posibles reguladores de TORC1, principalmente con la idea inicial de descartar candidatos con vista a entender que ocurre con la actividad TORC1 durante la formación del filamento infectivo.

Como se comento en la introducción, TORC1 presenta una regulación diferente en cada sistema estudiado. En metazoos, TORC1 necesita la activación conjunta por la proteína Rheb1 y el complejo GTR (Sancak et al., 2008; Sancak and Sabatini, 2009; Efeyan et al., 2013). Sin embargo, en levaduras, Rheb1 es requerido en *S. pombe* pero no en *S. cerevisiae* (Kama et al., 2007; Urano et al., 2007) y con respecto al homólogo a GTR en estos hongos, parece ser redundante con otros sistemas (como Pib2) para activar TORC1 en *S. cerevisiae* (Varlakhanova et al., 2017; Ukai et al., 2018) mientras que en *S. pombe* actuaría como un modulador negativo de TORC1 (Chia et al., 2017). En *U. maydis* existen posibles homólogos a Rheb1 y el complejo regulador negativo TSC (compuesto por Tsc1 y Tsc2), así como a los componentes del complejo GTR (Gtr1 y Gtr2), y del complejo GATOR1 (SEACIT en *S. cerevisiae*, compuesto por Iml1, Npr2 y Npr3), que controla de manera negativa el complejo GTR (actúa como GAP de Gtr1) (Fig. 29A).

A

<i>U. maydis</i>	Annotation number	<i>S. cerevisiae</i> (E value)	<i>S. pombe</i> (E value)
Gtr1	umag_11426	Gtr1 (6.8e ⁻⁶⁸)	Gtr1 (8.8e ⁻⁶⁹)
Gtr2	umag_12201	Gtr2 (5.8e ⁻⁰⁹)	Gtr2 (8.2e ⁻¹³)
Iml1	umag_01612	Iml1 (2.5e ⁻⁶²)	Iml1 (2.3e ⁻⁷⁸)
Npr2	umag_10086	Npr2 (6.7e ⁻²²)	Npr2 (1.5e ⁻⁴³)
Npr3	umag_02998	Npr3 (1.1e ⁻⁰⁶)	Npr3 (1.4e ⁻¹⁵)
Rhb1	umag_05654	N.A.	Rhb1 (1.0e ⁻⁶⁵)
Tsc1	umag_10174	N.A.	Tsc1 (1.3e ⁻²⁶)
Tsc2	umag_10623	N.A.	Tsc2 (5.8e ⁻⁴⁵)

B

Fig. 29. Reguladores de TORC1 en *U. maydis*. **A.** Se indica la secuencia codificante putativa (*annotation number*) con mayor índice de similitud (E value) a nivel de secuencia de aminoácidos, tras una búsqueda en el genoma anotado de *U. maydis*, usando tanto las proteínas de *S. pombe* como las de *S. cerevisiae*. **B.** Posible esquema regulador de TORC1 en *U. maydis*.

Los componentes del complejo Ragulator, que anclan al heterodimero GTR a la membrana vacuolar, no están conservados a nivel de secuencia aminoacídica y por ello no se encontraron con una búsqueda de similitud de secuencia. Con los elementos encontrados, la hipótesis más simple era asumir una regulación dual positiva, más similar a la observada en metazoos (Fig. 29B).

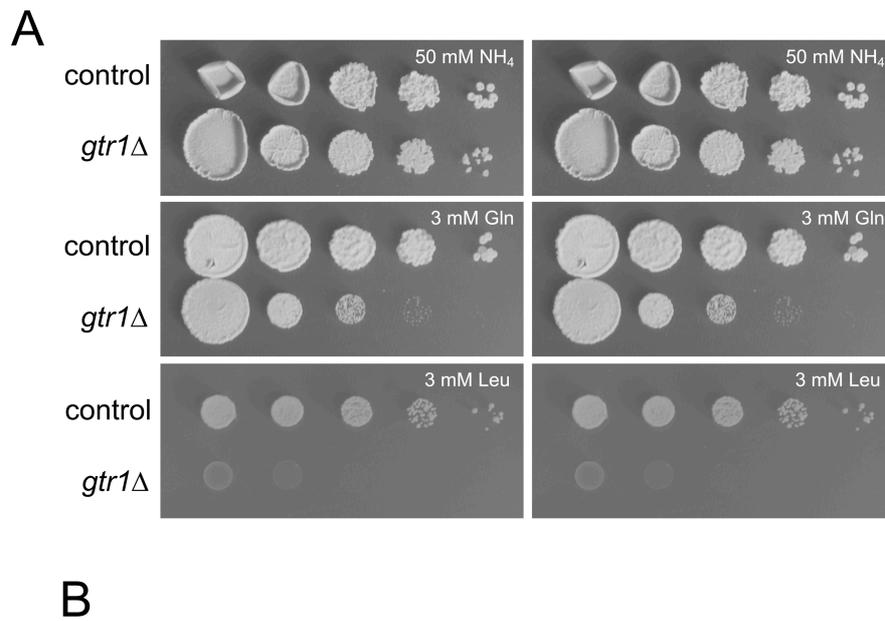


Fig. 30. Caracterización de los reguladores de TORC1 en *U. maydis*. **A.** Crecimiento en medio sólido (YPD) en presencia de Rapamicina a las concentraciones indicadas, de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, AB33, *gtr1Δ* UMP336, *iml1Δ* AUM35, *tsc2Δ* AUM101, *iml1Δ tsc2Δ* AUM57, *iml1Δ gtr1Δ* AUM220) tras una incubación de 2 días a 28°C. **B.** Crecimiento en medio mínimo nitrato en presencia de Rapamicina a las concentraciones indicadas, de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, AB34, *Pnar1: rhb1*^{K127R} AUM215) tras una incubación de 3 días a 28°C. **C.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de un alelo de Maf1 marcado con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes indicadas (control, AB34, *Pnar1: rhb1*^{K127R} AUM215 , *tsc2Δ* AUM208) crecidos en medio mínimo nitrato.

La proteína Rhb1 parece ser esencial en *U. maydis*, y de hecho nuestros intentos para obtener un mutante condicional por intercambio del promotor endógeno del gen *rhb1* con el promotor *Pnar1* fueron infructuosos. Como alternativa para asociar Rhb1 a la ruta TORC1, decidimos expresar un alelo de ganancia de función de esta proteína. Basándonos en un trabajo previo en *S. pombe*, donde describían una serie de mutaciones que producían alelos hiperactivos de Rhb1 (Urano et al., 2007) y apoyándonos en la alta similitud a nivel de la secuencia de aminoácidos entre Rhb1 de *U. maydis* y de *S. pombe*, construimos el alelo *rhb1*^{K127R} bajo el control del promotor *Pnar1* para ser introducido como una copia ectópica. De un modo paralelo también construimos alelos de pérdida de función por deleción en *tsc2* (para eliminar la

función del complejo TSC), en *iml1* (para eliminar la función del complejo GATOR1) y en *gtr1* (para eliminar la función del complejo GTR). Con estos mutantes, solos y en combinaciones se analizó la sensibilidad a Rapamicina como una medida indirecta de su acción sobre TORC1 (Figs. 30 A y B). De un modo coherente al esquema propuesto en la Fig. 29B, la pérdida de función de los reguladores negativos de TORC1 (GATOR1 y TSC) solos o en combinación, así como la expresión del alelo hiperactivo *rhb1*^{K127R} dieron como resultado una mayor resistencia a Rapamicina. En cambio, la inactivación de GTR produjo un aumento de la sensibilidad a Rapamicina, siendo además este efecto dominante en el doble mutante *gtr1Δ iml1Δ*.

Analizamos también los efectos sobre la movilidad electroforética de Maf1 de diversos mutantes (Fig. 30C).

Por analogía a lo descrito en otros sistemas, en el esquema regulatorio expuesto en el apartado anterior se asume que la información nutricional (presencia de aminoácidos) se integraría vía el complejo GTR y su regulador negativo GATOR1. De acuerdo con esta idea, comprobamos que la falta del complejo GTR no afectaba la capacidad para crecer en una fuente de nitrógeno inorgánica (NH₄) pero sí afectaba a la capacidad para crecer cuando la fuente de nitrógeno eran aminoácidos (en concreto probamos Gln y Leu, que son detectados directamente por los complejos que regulan GTR en otros sistemas) (Fig. 31A). Pensamos que estos defectos en el crecimiento son debidos a la incapacidad de transmitir a la ruta TORC1 la presencia de los aminoácidos, como lo apoya la baja actividad TORC1 de los mutantes *gtr1Δ* creciendo en Gln como fuente de nitrógeno (Fig. 31B).

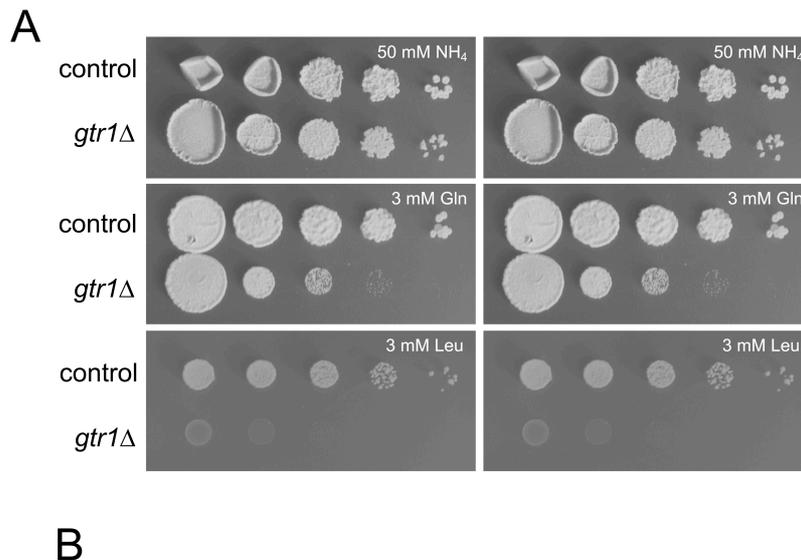


Fig. 31. GTR y GATOR1 transmiten la presencia de aminoácidos a la célula. A. Crecimiento en medio sólido con 50 mM de amonio (NH₄), 3mM de glutamina (Gln), o 3mM de leucina (Leu), como única fuente de nitrógeno de diluciones seriadas (en factores de 10) de los distintos cultivos (control, AB33, *gtr1Δ* UMP336, *iml1Δ* AUM35, *nar1Δ* UMP194, *gtr1Δ nar1Δ* UMP337, *iml1Δ nar1Δ* AUM216, *iml1Δ gtr1Δ* AUM220) tras una incubación de 3 días a 28°C. **B.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de un alelo de Maf1 marcado con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes indicadas (control AUM210 y *gtr1Δ* AUM219) crecidos en medio rico (YPD) y en mínimo con 50 mM de amonio (NH₄) o 3mM de glutamina (Gln) como única fuente de nitrógeno.

Tomados todos en conjunto, los resultados obtenidos apoyaban la idea que Rbh1 controlaba positivamente a TORC1, mientras que Tsc2 actuaba como regulador negativo, probablemente a través de Rbh1 (por comparación con otros sistemas). Así mismo, parecía que GTR actuaba regulando positivamente a TORC1 y GATOR1 parecía actuar negativamente sobre GTR y permitía la transferencia de la información nutricional (aminoácidos) a TORC1 (Fig. 29B).

La presencia de un complejo b activo no vuelve insensible a la ruta TORC1 a la falta de fuente de nitrógeno.

Una de las posibles explicaciones del mantenimiento de la actividad TORC1 en el filamento infectivo, incluso en condiciones de no asimilación de nitrógeno, era que la presencia de un complejo b activo volviese insensible el complejo TORC1 a la falta de fuente de nitrógeno. Para al menos descartar esta

explicación, intentamos eliminar la capacidad de transmitir dicha información al complejo TORC1, y preguntarnos si en estas condiciones las células eran capaces de inducir la formación del filamento infectivo. Cuando analizamos la capacidad para formar filamentos infectivos en mutantes faltos de función GTR o de función GATOR1 observamos que en ambos casos los mutantes fueron capaces de producir filamentos, aunque mientras que en mutantes *iml1Δ* los filamentos fueron similares al control, en el caso de mutantes *gtr1Δ* el tamaño medio de los filamentos fue algo menor que el control (control $82,65 \pm 21,64 \mu\text{m}$, *iml1Δ* $85,54 \pm 19,00 \mu\text{m}$, *gtr1Δ* $75,51 \pm 11,50 \mu\text{m}$). Interesantemente, cuando se combinó esta mutación con la falta de asimilación de nitrato, entonces la capacidad para filamentar prácticamente desapareció en el caso del doble mutante *gtr1Δ nar1Δ* al igual que sucedió en el mutante *iml1Δ nar1Δ* (*nar1Δ* $54,85 \pm 11,75 \mu\text{m}$, *gtr1Δ nar1Δ* $30,10 \pm 9,46 \mu\text{m}$, *iml1Δ nar1Δ* $22,87 \pm 5,75 \mu\text{m}$) (Figs. 32A y B).

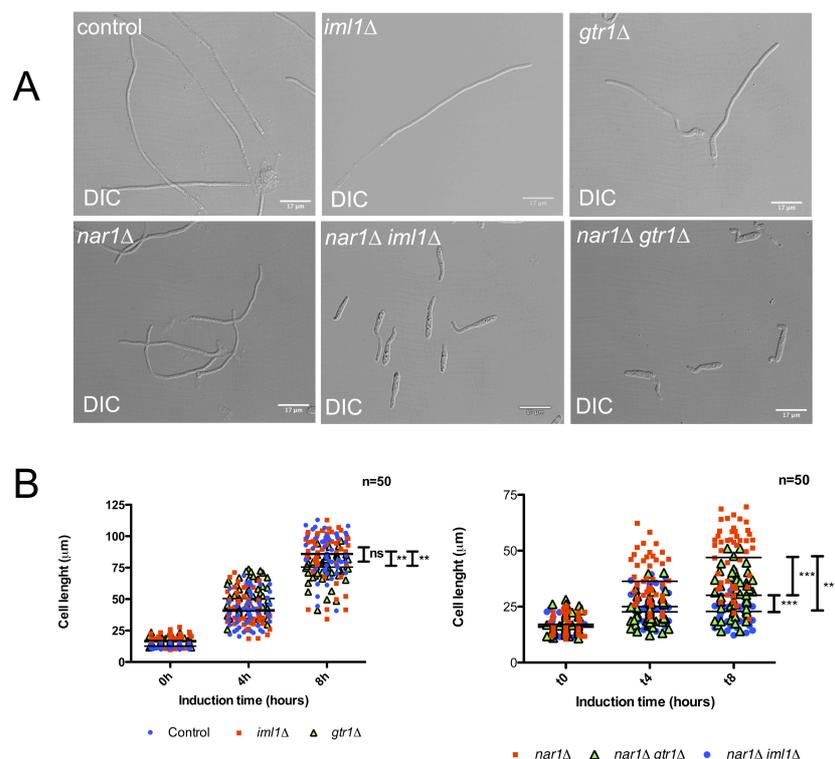


Fig. 32. El filamento infectivo no se vuelve insensible a la fuente de nitrógeno. A. Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33, *iml1Δ* AUM35, *gtr1Δ* UMP336, *nar1Δ* AUM194, *nar1Δ iml1Δ* AUM216, *nar1Δ gtr1Δ* UMP337. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

Estos resultados indicaban que, durante la formación del filamento infectivo, TORC1 seguía siendo sensible a la información nutricional, descartando por lo tanto que la presencia del complejo b durante la formación del filamento infectivo volviese a la ruta TORC1 insensible de alguna manera a la falta de fuente de nitrógeno.

La formación del filamento infectivo se ve comprometida en ausencia de asimilación de nitrógeno cuando la autofagia esta inhibida.

Los resultados anteriores nos sugerían que, en presencia de un complejo b activo, incluso en condiciones en las que no existía una asimilación neta de nitrógeno, el complejo TORC1 se mantenía activo. Ahora bien, esta actividad parecía depender de su capacidad para detectar la presencia de aminoácidos libres. Ello nos llevaba a plantearnos el origen de la posible fuente generadora de esos aminoácidos, que obviamente no era el medio de cultivo. Una posibilidad fue que dicha fuente fuera el resultado de un proceso de autofagia, y por ello decidimos evaluar esta posibilidad inactivando la capacidad de sufrir autofagia por parte de *U. maydis*. En un trabajo previo (Nadal and Gold, 2010), se habían descrito dos genes implicados en autofagia en *U. maydis*, Atg1 y Atg8. Atg1 es la kinasa reguladora maestra que activa autofagia, mientras que Atg8 es necesaria para los pasos finales de la autofagia. Ambas proteínas son necesarias para mantener autofagia en *U. maydis*, y su falta de función afecta la capacidad virulenta de *U. maydis*. Sin embargo, no parecen ser necesarias para la formación del filamento infectivo.

Nosotros, deletamos el gen *atg1* en el fondo genético AB33, en estirpes capaces e incapaces de asimilar nitrato. Observamos que la falta de Atg1 no pareció afectar la formación del filamento infectivo en condiciones que permitían la asimilación de nitrato, pero que interesantemente, cuando esta capacidad no existía, ahora la formación del filamento infectivo se vio muy afectada (Fig. 33). De un modo coherente, cuando analizamos el nivel de actividad TORC1, encontramos que existía una clara correlación entre la formación del filamento infectivo y maf1 movilidad.

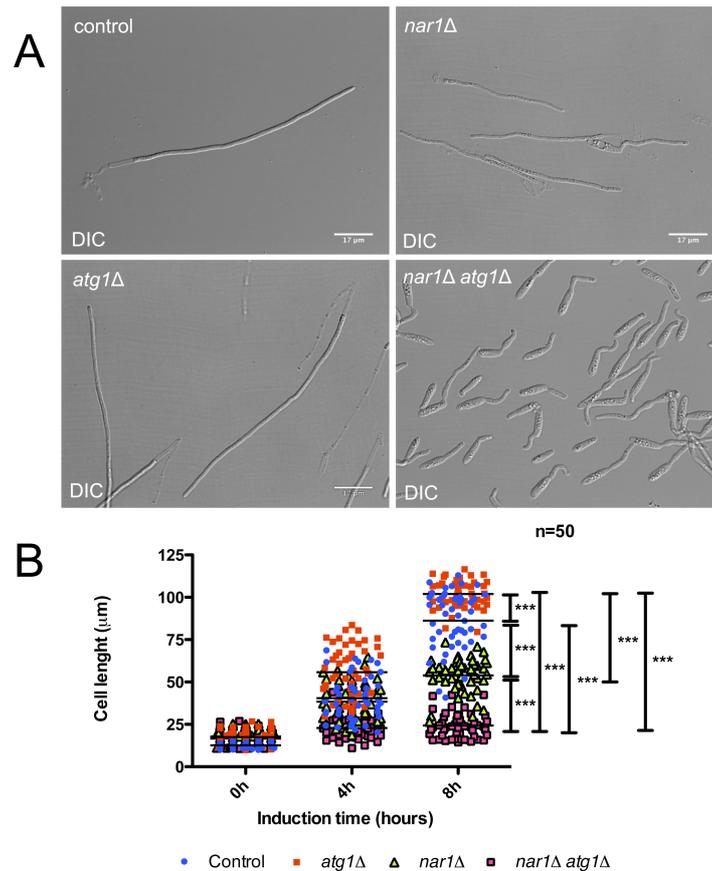


Fig. 33. La falta de autofagia afecta a la formación del filamento infeccioso en condiciones nutricionales deficientes. A. Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33, *atg1Δ* AUM165, *nar1Δ* AUM194, *nar1Δ atg1Δ* AUM195 **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infecciosos de las estirpes indicadas. **C.** Ensayo de electroforesis en gel mostrando la distinta movilidad de un alelo de Maf1 marcado con el epítipo 3HA, a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes indicadas (*nar1Δ* AUM194 y *nar1Δ atg1Δ* AUM195) crecidos en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno.

De un modo coherente, cuando analizamos el nivel de actividad TORC1, encontramos que existía una clara correlación entre la formación del filamento infeccioso y maf1 movilidad.

La autofagia está incrementada en el filamento infeccioso.

Los resultados anteriores sugerían fuertemente que durante la formación del filamento infeccioso debería existir un proceso de autofagia activo. Por ello se analizó la tasa autofágica durante la formación de dicha estructura. Para ello se volvió a emplear el ensayo de proteólisis de la fusión GFP-Atg8 descrito en la Fig. 5. Como en casos anteriores, para poder distinguir los efectos atribuibles al

cambio de condiciones nutricionales de los debidos a la presencia de un programa b activo, usamos como control el fondo genético incapaz de producir un complejo b activo (AB34). Como se observa en la Fig. 34, en condiciones de presencia del complejo b activo existía una mayor señal en la banda correspondiente a la GFP libre.

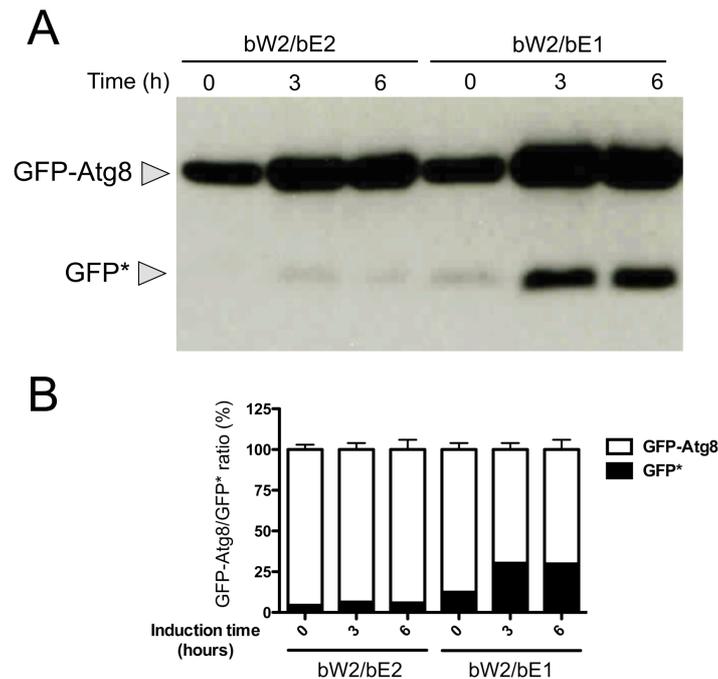


Fig. 34. La autofagia está incrementada en el filamento infectivo. **A.** Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b no activo (bW2/bE2, AUM174) o activo (bW2/bE1, AUM171) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado. **B.** Cuantificación del nivel de autofagia, medida como la razón entre los niveles de GFP-Atg8 y de GFP liberada (GFP*). Se muestra la media de tres geles independientes.

Para confirmar que en efecto el aumento de la banda correspondiente a GFP libre era debido a autofagia, comprobamos que su aparición era dependiente de una proteína Atg1 funcional, como fue el caso (Fig. 35A), y además analizamos si existía un aumento de vacuolas autofágicas en el filamento. Para ello, cuantificamos en estirpes que producían un complejo b activo y en estirpes que producían un complejo b inactivo, la co-localización de la señal

correspondiente a GFP de una fusión GFP-Atg8 con la señal correspondiente a Cherry en las vacuolas proporcionada por la expresión de una fusión Cherry-Carboxipeptidasa Y (un marcador vacuolar en *U. maydis* (Schirawski et al., 2005). Los resultados obtenidos indicaron un claro aumento de vacuolas autofágicas en el filamento infectivo (Fig. 35B, C).

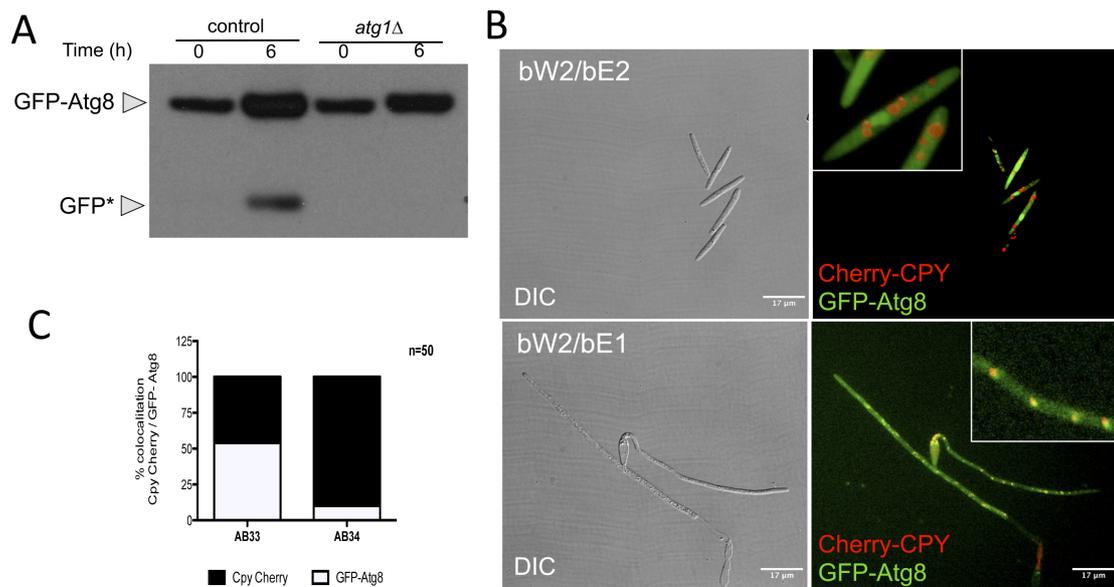


Fig. 35. Análisis de la autofagia en el filamento infectivo. **A.** Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b activo en un fondo silvestre para Atg1 (control, AUM171) o mutante (*atg1Δ*, AUM165) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado. **B.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia mostrando la acumulación de vacuolas autofágicas (co-localización de los marcadores cherry y GFP) en las estirpes que expresan un complejo b no activo (bW2/bE2, AUM191) o activo (bW2/bE1, AUM189) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno durante 8h. **C.** Cuantificación de la co-localización de ambos marcadores.

En conclusión, durante la formación del filamento infectivo existía una activación del proceso de autofagia, que no era atribuible a los cambios de medio nutricional requeridos para la inducción del factor b.

La autofagia en el filamento infectivo parece ser TORC1 dependiente.

Los resultados mostrados en el anterior apartado indican que durante la formación del filamento infectivo la autofagia se encuentra incrementada. En otros organismos, la ruta TORC1 regula negativamente este proceso catabólico (Noda and Ohsumi, 1998; Ganley et al., 2009). Por otro lado, resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis también indicaron que la actividad TORC1 no solo es requerida para la formación del filamento infectivo, sino que además se mantiene alta incluso en condiciones nutricionales adversas. Tomados en conjunto estos resultados nos hicieron plantearnos cual era la relación entre la ruta TORC1 y la autofagia durante la formación del filamento infectivo. Como primera aproximación, nos preguntamos si el tratamiento con Rapamicina, que inhibe la ruta TORC1, tendría algún efecto en la tasa de autofagia en el filamento. La ventaja de usar Rapamicina en lugar de Torin1 para inhibir la actividad Tor1 en este caso radicaba en que ya habíamos demostrado que, aunque su nivel de inhibición era insuficiente para afectar la formación del filamento infectivo (Fig. 12), al menos si era capaz de producir una tasa más elevada de autofagia en una estirpe control (Fig.5B). Mientras que en células control, que no eran capaces de producir un complejo b activo, el tratamiento con Rapamicina aumentaba la tasa autofágica, como era de esperar, sorprendentemente, en las células que producían un complejo b activo, el tratamiento con Rapamicina redujo la tasa autofágica. Este resultado sugería que, durante la formación del filamento infectivo, la actividad TORC1 no solo no inhibía la inducción de autofagia, sino que parecía potenciarla (Fig. 36).

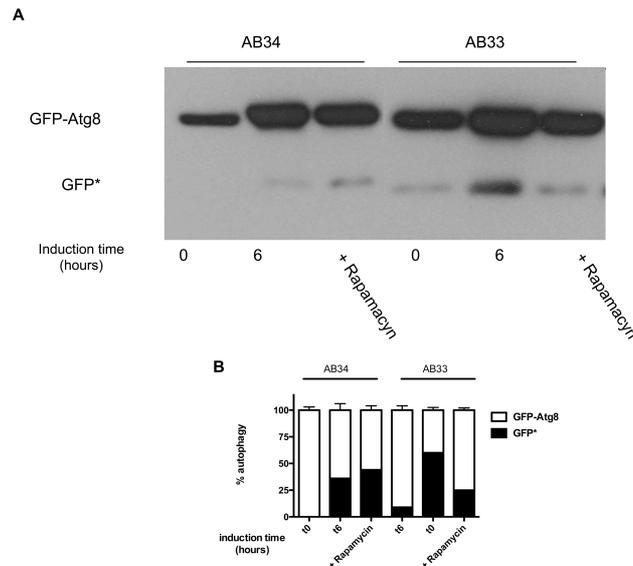


Fig. 36. La autofagia presente en el filamento infeccioso parece ser TORC1 dependiente. A. Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b no activo (bW2/bE2, AUM174) o activo (bW2/bE1, AUM171) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado y tratados o no con 1µg/ml de Rapamicina **B.** Cuantificación del nivel de autofagia, medida como la razón entre los niveles de GFP-Atg8 y de GFP liberada (GFP*). Se muestra la media de tres geles independientes.

La posibilidad de que TORC1 esté activando autofagia durante la formación del filamento infeccioso, aunque atractiva, choca frontalmente con la idea actual de regulación negativa cruzada entre TORC1 y autofagia (Noda and Ohsumi, 1998; Ganley et al., 2009). Por ello, decidimos forzar el sistema e incrementar la actividad TORC1 durante la formación del filamento infeccioso y analizar que ocurría con la autofagia en esas condiciones. Para ello, en estirpes derivadas de AB33 que además portaban una fusión GFP-Atg8, eliminamos el gen *tsc2* o insertamos el alelo *rhb1*^{K127R} bajo el control del promotor *Pnar1* como una copia ectópica. Los resultados obtenidos (Fig. 37) indicaron que la sobreactivación de TORC1 durante la formación del filamento infeccioso no solo no redujo la tasa autofágica, sino que la aumentó de una manera espectacular, especialmente en el caso de la sobreproducción del alelo hiperactivado de Rheb1. Además, este aumento fue sensible a la adición de Rapamicina, indicando claramente que era TORC1 dependiente.

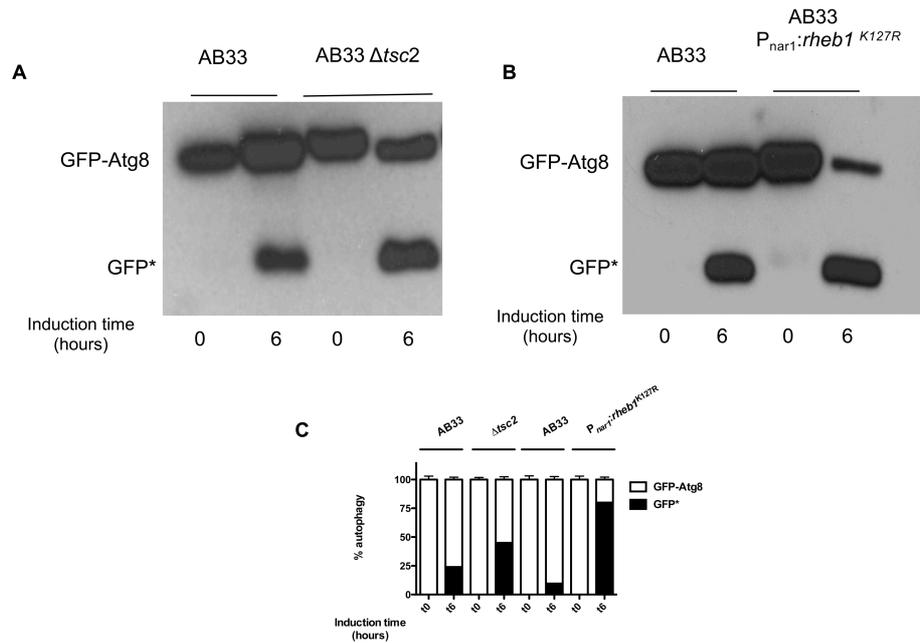


Fig. 37. La sobreactivación de TORC1 aumenta la autofagia en el filamento infectivo. A. Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b activo, y portan mutaciones que sobreactivan la ruta TORC1 (control, AUM171; *Pnar1: rhb1*^{K127R}, AUM186, *tsc2* Δ , AUM158) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado y tratados o no con 1 μ g/ml de Rapamicina. **B.** Cuantificación del nivel de autofagia, medida como la razón entre los niveles de GFP-Atg8 y de GFP liberada (GFP*). Se muestra la media de tres geles independientes.

TORC1 activa la autofagia a través de la S6K Aga1.

Los resultados anteriores indicaban que, de alguna manera, durante la formación del filamento infectivo, TORC1 parecía estar activando autofagia. Previamente habíamos mostrado que la formación del filamento infectivo requería las dos S6K de TORC1 en *U. maydis*, Sch9 y Aga1. Por ello, nos preguntamos si estas kinasas podían ser requeridas también para la activación de la autofagia vía TORC1. Con el fin de analizar esta posibilidad, se analizó la tasa autofágica de las estirpes que producían el complejo b activo y portaban los alelos de pérdida de función de *sch9* y *aga1* tras 6 horas creciendo en medio inductor. Interesantemente, aunque la pérdida de función de Sch9 no pareció afectar, la falta de función de Aga1 sí redujo drásticamente los niveles de autofagia durante la formación del filamento infectivo (Fig. 38).

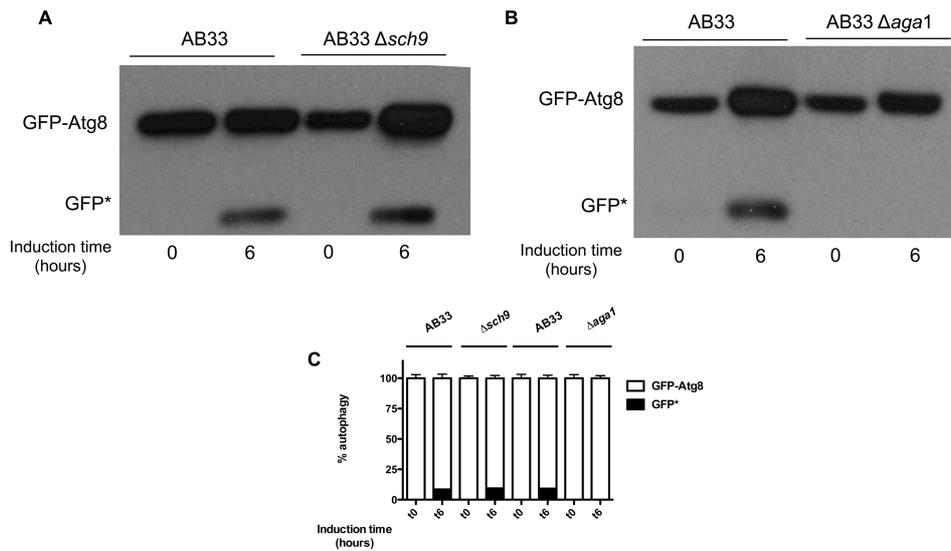


Fig. 38. Las S6 kinasa Aga1 es requerida para la activación de la autofagia en el filamento infectivo. **A.** Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b activo, y portan mutaciones en las S6 kinasas (control, AUM171; *sch9* Δ AUM190, *aga1* Δ , AUM172) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado. **B.** Cuantificación del nivel de autofagia, medida como la razón entre los niveles de GFP-Atg8 y de GFP liberada (GFP*). Se muestra la media de tres geles independientes.

La sobreactivación de TORC1 induce autofagia de una manera independiente de la presencia de un complejo b activo.

La sorprendente activación de la autofagia por la ruta TORC1 a través de Aga1, una de sus S6 kinasas, nos planteó la cuestión de si realmente este fenómeno era absolutamente dependiente del programa transcripcional inducido por el complejo b. Por ello, analizamos el nivel de autofagia en una estirpe que no producía un complejo b funcional (fondo genético AB34) en condiciones de sobreactivación de TORC1 bien por pérdida de función de Tsc2 o por expresión del alelo *rhb1*^{K127R}. Sorprendentemente, en este caso también observamos una activación de la autofagia, que además era sensible al tratamiento con Rapamicina, confirmando su dependencia de la actividad TORC1. (FIG-39).

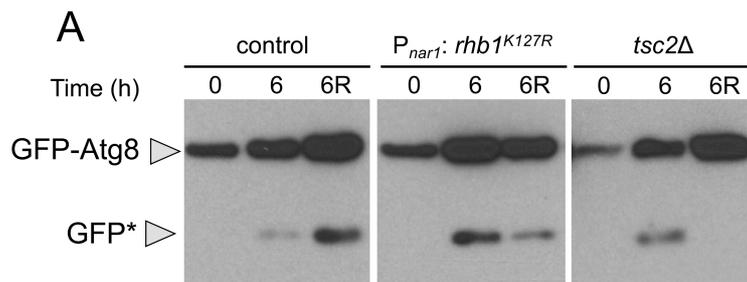


Fig. 39. Altos niveles de actividad de TORC1 inducen autofagia de una manera no dependiente del complejo b. A. Ensayo de electroforesis en gel seguido de *western blot* con un anticuerpo anti-GFP, mostrando el procesamiento vacuolar de una fusión GFP-Atg8 a partir de extractos celulares obtenidos de cultivos celulares de estirpes que expresan un complejo b inactivo, y portan mutaciones que sobreactivan TORC1 (control, AUM171; $P_{nar1}: rhb1^{K127R}$ AUM186, $tsc2\Delta$, AUM158) crecidos en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno por el tiempo indicado y tratados o no con 1 μ g/ml de Rapamicina .

Interesantemente, los niveles de autofagia observados en las estirpes que no producían un complejo b activo parecían ser inferiores en comparación con las observadas en estirpes con un complejo b activo en similares condiciones. Esto sugería que aunque la activación de la autofagia por altos niveles de actividad TORC1 en *U. maydis* parecía ser independiente de la presencia de un complejo b, si podría existir algún tipo de potenciación del proceso en presencia del complejo b. Una manera de explicar esta potenciación dependiente de b es el hecho de que los niveles de Aga1 aumentan notablemente de una manera b-dependiente, entre otras razones por una mayor tasa de transcripción del gen (Fig. 40).

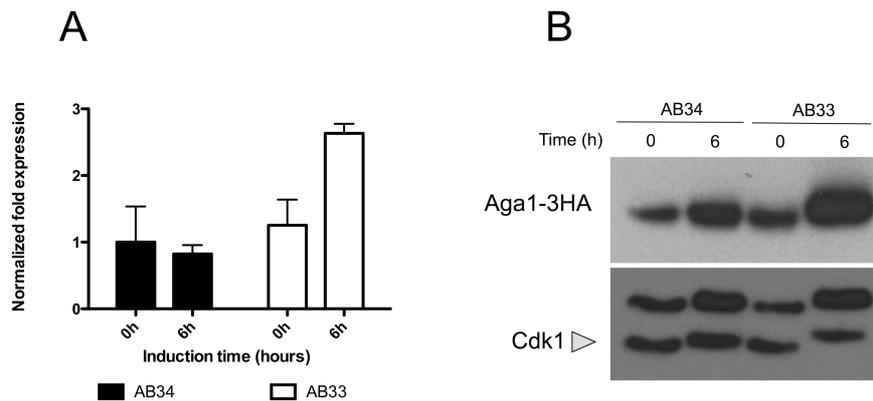


Fig. 40. Los niveles de Aga1 se incrementan en el filamento infectivo A, RT-PCR cuantitativa para *aga1* en las estirpes indicadas. El ARN se aisló en los tiempos indicados tras la transferencia de las células a medio mínimo nitrato. Como control interno, se usó la expresión de *tub1*. Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (tiempo 0, AB34). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes. **B**. Niveles de Aga1-3HA. Las cargas en cada gel se ajustaron usando como control los niveles de Cdk1 (utilizando un anticuerpo anti-PSTAIRE).

Para comprobar si esta explicación era correcta, analizamos la capacidad de la sobreactivación de TORC1 para activar autofagia en condiciones de falta de la función Aga1. Los resultados nos indicaron que mientras que en células que producían un complejo b inactivo, esta activación era absolutamente dependiente de Aga1, en células que producían un complejo b activo, incluso en ausencia de Aga1 se podía apreciar un aumento en la autofagia, sugiriendo fuertemente un segundo mecanismo para activar la autofagia que sí parecía dependiente de un complejo b activo (Fig.41).

Una actividad TORC1 elevada es perjudicial para la formación del filamento infectivo.

Un fenotipo secundario que observamos durante el estudio de los efectos de sobreactivación del complejo TORC1 en estirpes que expresaban un complejo b activo fue que, en estas condiciones, el filamento infectivo no lograba formarse. La Fig.42 muestra que estirpes derivadas de AB33 que o bien tenían eliminado el gen *tsc2* o bien expresaban el alelo *rhb1*^{K127R}, no formaban un filamento infectivo y a cambio aparecía un ligero abombamiento del extremo

donde debería aparecer el filamento, como si el crecimiento polar estuviese impedido. Además, este efecto observado era debido a un exceso de actividad TORC1 porque el tratamiento de estas células con Rapamicina restituía de nuevo la formación del filamento.

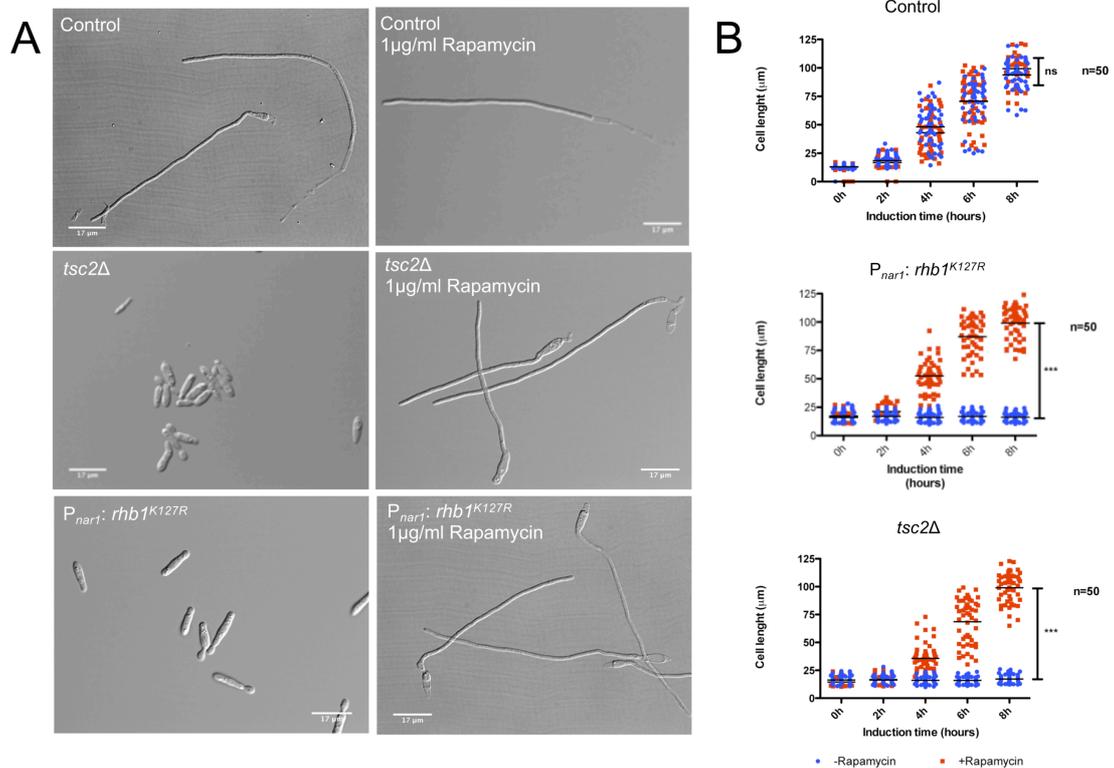


Fig. 42. Alta actividad TORC1 parece inhibir el crecimiento polar del filamento infectivo.
A. Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo nitrato con y sin Rapamicina (1 μg/ml) añadida. Control AB33, *tsc2Δ* AUM101, *P_{nari}: rhb1^{K127R}* AUM168. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

Como hemos observado que la sobreactivación de TORC1 aumentaba de un modo notable la actividad autofágica (Fig. 37), nos planteamos que tal vez esta fuera la causa de los defectos en filamentación. Sin embargo, no pareció ser esta la explicación dado que un doble mutante *tsc2Δ atg1Δ*, donde en principio esperaríamos que no existiese autofagia, tampoco fue capaz de producir un filamento infectivo (Fig. 43).

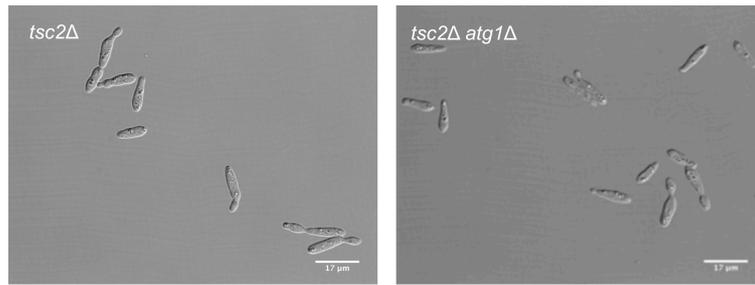


Fig. 43. Un exceso de autofagia no parece ser la causa de la falta de filamentación en estirpes con alta actividad TORC1. Fotografías de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo nitrato (*tsc2Δ* AUM101, *tsc2Δ atg1Δ* AUM218)

También nos planteamos si este efecto observado era dependiente de las S6 kinasas o era algo relacionado con otro tipo de dianas de TORC1 en la célula. Por ello analizamos la capacidad para hacer filamentos en mutantes dobles *tsc2Δ sch9Δ* y *tsc2Δ aga1Δ*, así como en el mutante triple *tsc2Δ sch9Δ aga1Δ* (Fig. 44). El resultado obtenido indicaba que la pérdida de función de las dos S6 kinasas restablecía de nuevo la capacidad de las células para crecer de un modo polarizado. Los valores de tamaño medio del filamento del triple mutante (*tsc2Δ sch9Δ aga1Δ* $43,99 \pm 9,63 \mu\text{m}$) no fueron similares a los de un control silvestre (control $98,72 \pm 9,02 \mu\text{m}$) pero sí eran del rango del tamaño observado en los filamentos producidos en un fondo AB33 sin las dos S6 kinasas (*sch9Δ aga1Δ* $47,23 \pm 11,66 \mu\text{m}$) (Fig. 22).

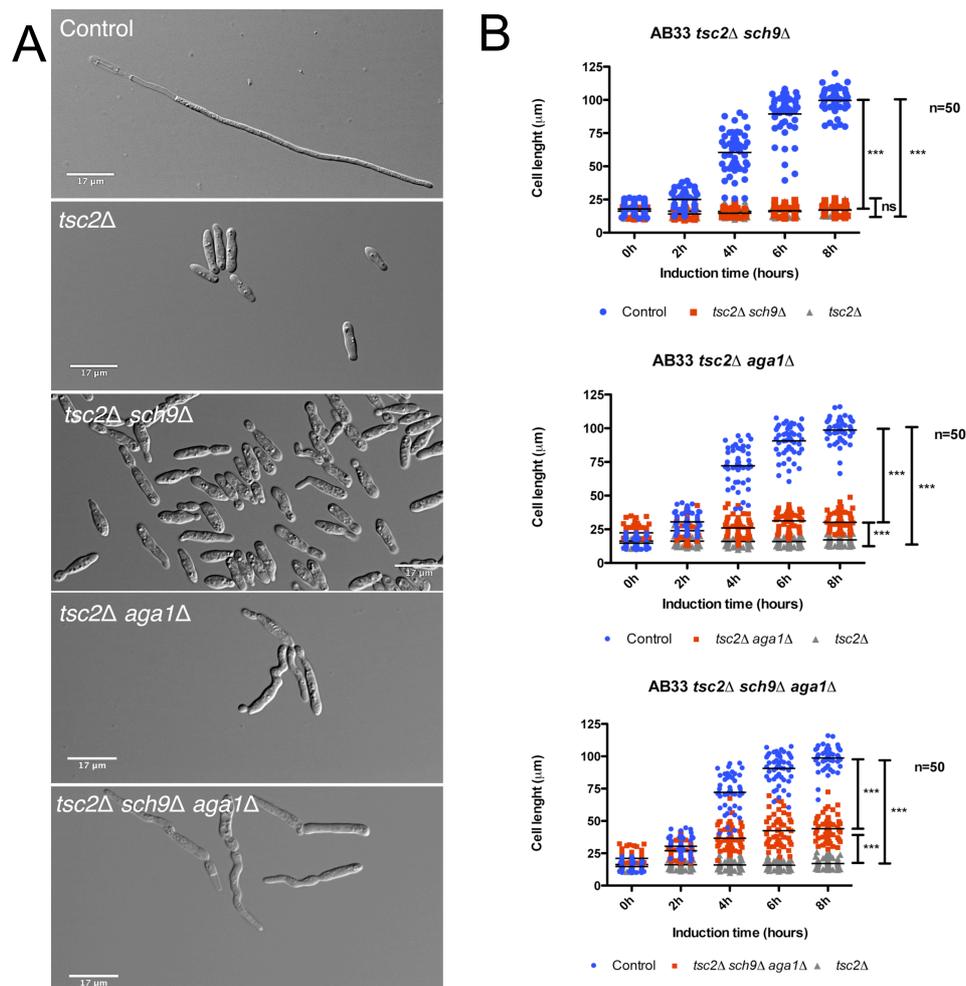


Fig. 44. Las S6 kinasas están implicadas en el defecto en filamentación consecuencia de una alta actividad de TORC1. A. Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33; *tsc2* Δ AUM101; *tsc2* Δ *sch9* Δ , AUM117; *tsc2* Δ *aga1* Δ , AUM123; *tsc2* Δ *sch9* Δ *aga1* Δ , AUM128. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

La sobreexpresión de la subunidad catalítica de PKA genera una fenocopia de los mutantes de alta actividad TORC1 con respecto a la falta de crecimiento polar del filamento infectivo.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que la ruta TORC1 controla de una forma positiva a la ruta de PKA a través de la S6K Sch9 (Soulard et al., 2010). Por otra parte, en *U. maydis* se ha establecido que la ruta PKA se encuentra inhibiendo el crecimiento, en claro contraste con lo descrito en otros sistemas fúngicos, como *S. cerevisiae* o *C. albicans*, donde una alta actividad de la ruta PKA genera un crecimiento polar (Sanchez-Martinez and Perez-Martin, 2001).

Nos planteamos entonces si podría existir alguna relación entre la inhibición del crecimiento polar observado en respuesta a altos niveles de TORC1 y la ruta PKA en *U. maydis*. Una hipótesis de trabajo inicial fue que de igual manera que en *S. cerevisiae* TORC1 activa PKA, en *U. maydis*, la alta actividad de TORC1 en nuestros mutantes podría estar activando a PKA y esto a su vez provocaría un empeoramiento en la capacidad para crecer de un modo polarizado en el filamento infectivo.

La PKA en *U. maydis* esta compuesta por una subunidad reguladora negativa, Ubc1 y una subunidad catalítica, Adr1. Los mutantes de pérdida de función en la subunidad catalítica Adr1 dejan de crecer como levaduras y crecen de un modo análogo a un hongo filamentoso (Durrenberger et al., 1998). Al contrario, la pérdida de función de la subunidad reguladora, Ubc1, produce una hiperactividad de la actividad PKA resultando en células que están afectadas en el establecimiento de la polaridad al crecer (son más redondeadas y con defectos en separación celular) (Gold et al., 1994). En primer lugar, nos preguntamos si altos niveles de actividad PKA serían capaces de inhibir el crecimiento polar de un filamento *b*-dependiente. Para contestar esta pregunta se construyó una estirpe en un fondo genético AB33, que expresase la subunidad catalítica de PKA bajo el control del promotor P_{dik6} (como una copia insertada ectópicamente), y por ello bajo el control indirecto del complejo b (Fig. 45A). Comprobamos que, en esta estirpe tras la inducción de los genes *b*, los niveles de mRNA de *adr1* aumentaban, como fue el caso (Fig. 45B). Interesantemente, tras 8 horas de inducción en medio mínimo nitrato, el fenotipo mostrado por esta estirpe fue muy similar al presentado por las estirpes mutantes que tenían sobreactivado TORC1 (*tsc2Δ* y expresión de *rhb1*^{K127R}) (Fig. 45C, D).

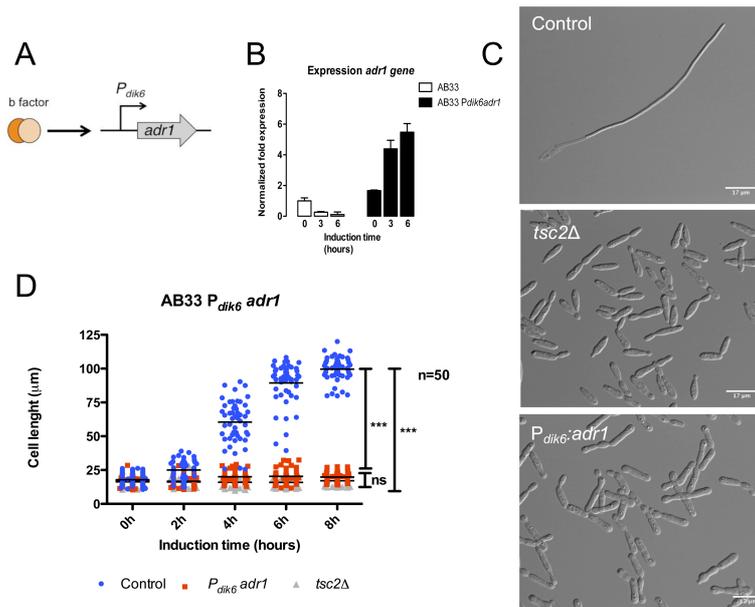


Fig. 45. Alta actividad PKA inhibe el crecimiento polar del filamento infectivo. **A.** Esquema del sistema utilizado para expresar una copia ectópica de *adr1* una vez que el programa dependiente de *b* esté activado. **B.** RT-PCR cuantitativa para *adr1* en una estirpe control (AB33) y una estirpe portando la construcción descrita en A. El ARN se aisló en los tiempos indicados tras la transferencia de las células a medio mínimo nitrato. Como control interno, se usó la expresión de *tub1*. Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (tiempo 0, AB33). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes. **C.** Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33; *tsc2Δ* AUM101; *P_{dik6}:adr1*, AUM118. **D.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

Observamos que en el caso de la sobreexpresión de *adr1* el tratamiento con Rapamicina no restituía el crecimiento polar, al contrario de lo que ocurría cuando sobreactivábamos la ruta TORC1 (Fig. 46). Esta observación indicaba que o bien no existía relación alguna entre PKA y TORC1 con respecto al control del crecimiento polar o bien, nuestra hipótesis más querida, que los efectos de PKA estaban aguas abajo de la ruta TORC1, y por ello dado que estábamos aumentando la actividad PKA de un modo independiente de TORC1 (por sobreexpresión génica) no estaba afectado por el tratamiento con Rapamicina.

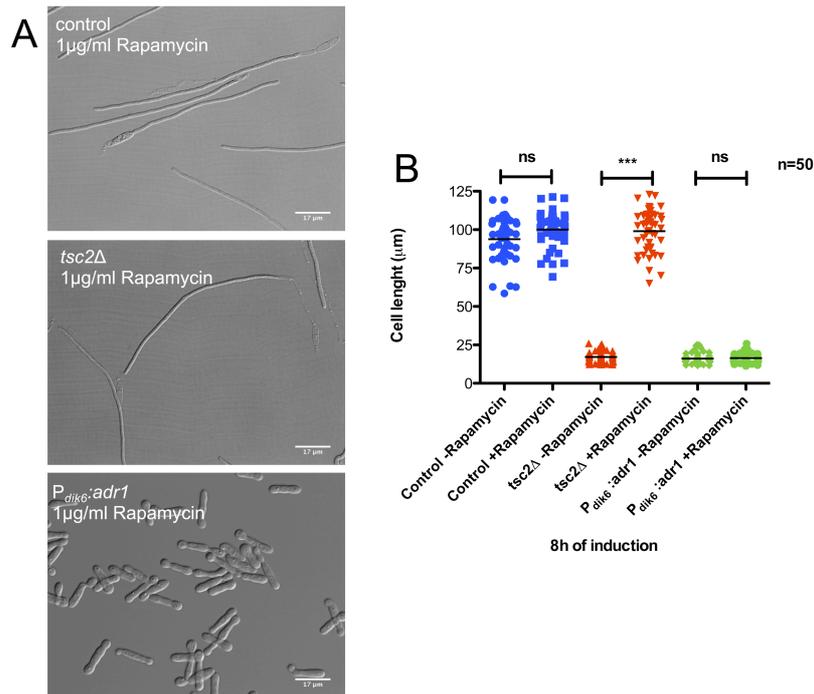


Fig. 46. Los defectos de filamentación debidos a altos niveles de PKA no son corregidos por Rapamicina. **A.** Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo nitrato con y sin Rapamicina (1μg/ml) añadida. Control AB33, *tsc2Δ* AUM101, *Pdik6:adr1* AUM118. **B.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas.

La represión de la actividad PKA en ausencia de Tsc2 rescata la formación del filamento infectivo.

Para apoyar la posibilidad de que PKA se encontrase aguas abajo de TORC1 y que la sobreactivación de TORC1 aumentase los niveles de actividad de PKA de alguna manera y ello tuviese como consecuencia la inhibición el crecimiento polar, decidimos reprimir la actividad PKA en un fondo AB33 *tsc2Δ* para ver si la formación del filamento infectivo era rescatada.

Para ello se siguieron dos estrategias. La primera consistió en expresar en un fondo genético AB33 *tsc2Δ*, la subunidad reguladora negativa de PKA (*ubc1*) bajo *P_{dik6}*, de forma análoga al caso anterior con *adr1* (Fig. 47A). De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, encontramos que en estas condiciones la formación del filamento infectivo fue rescatada casi a un nivel similar a la

estirpe control (control $99,65 \pm 8,88$, $tsc2\Delta$ $18,21 \pm 2,84$, $tsc2\Delta P_{dik6}: ubc1$ $71,02 \pm 17,37 \mu\text{m}$) (Fig. 47B, C).

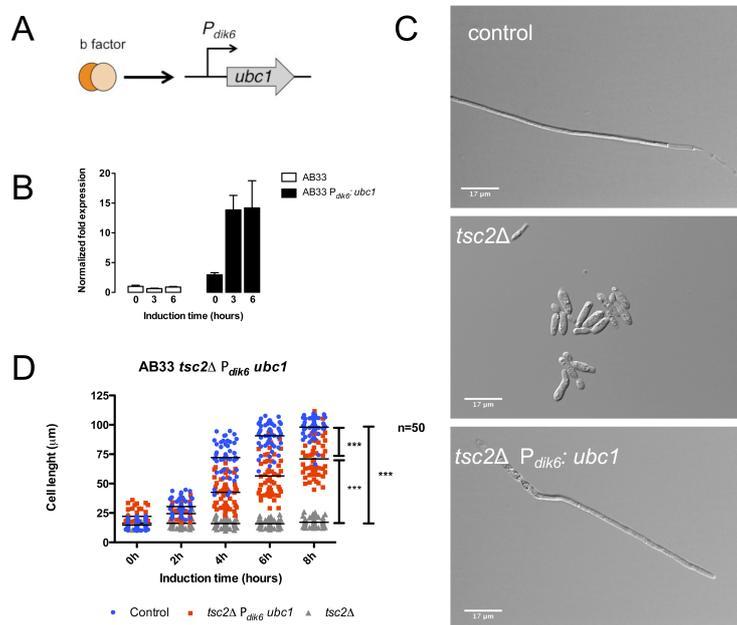


Fig. 47. La sobreexpresión del regulador negativo de PKA rescata el crecimiento polarizado de los filamentos que tienen sobreactivada la actividad TORC1. A. Esquema del sistema utilizado para expresar una copia ectópica de $ubc1$ una vez que el programa dependiente de b esté activado. **B.** RT-PCR cuantitativa para $ubc1$ en una estirpe control (AB33) y una estirpe portando la construcción descrita en A. El ARN se aisló en los tiempos indicados tras la transferencia de las células a medio mínimo nitrato. Como control interno, se usó la expresión de $tub1$. Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (tiempo 0, AB33). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes. **C.** Fotografía de cultivos de las estirpes indicadas tras 8 horas de incubación en medio mínimo con nitrato. Control AB33; $tsc2\Delta$ AUM101; $tsc2\Delta P_{dik6}: ubc1$, AUM182. **D.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos de las estirpes indicadas

La segunda aproximación consistió en una ablación genética del gen $adr1$ usando el sistema Cre-Lox en el fondo genético AB33 $tsc2\Delta$. A pesar de que el gen $adr1$ no es esencial en *U. maydis*, su pérdida de función tiene un efecto morfológico tan drástico (las células crecen de una manera filamentosa) que decidimos eliminar su función de una manera controlada, una vez el programa b estuviera activo. Para ello flanqueamos el locus $adr1$ con sitios lox usando la misma estrategia que utilizamos para $tor1$ y $rpt1$ (Fig. 48A) y usamos la versión

Cre-RE, que podíamos activar añadiendo 4-OHT al medio de inducción. Como se aprecia en la Fig. 48B, encontramos una muy buena correlación en la presencia de fluorescencia nuclear y la capacidad para rescatar el crecimiento polarizado (Fig. 48C).

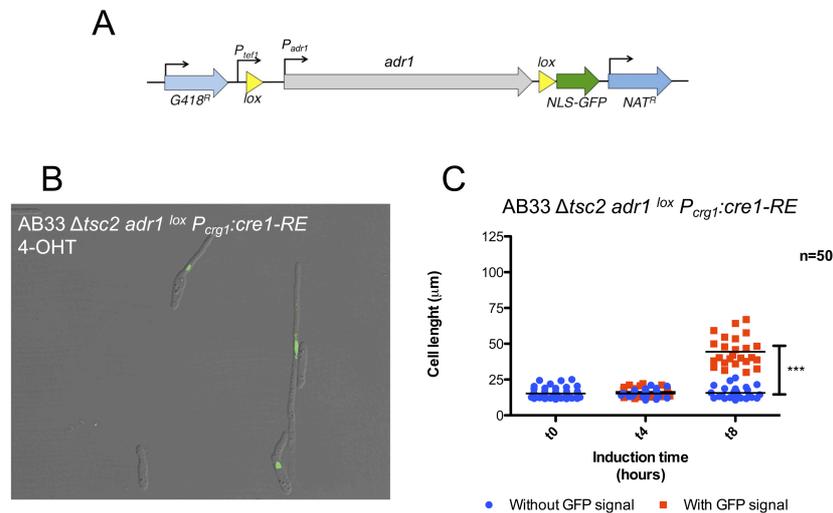


Fig. 48. La pérdida de función de PKA rescata el crecimiento polarizado de los filamentos que tienen sobreactivada la actividad TORC1. A. Esquema del locus $adr1^{lox}$. **B.** Fotografía de un cultivo de la estirpe AUM159, que lleva el alelo $adr1^{lox}$ y el transgen expresando la recombinasa Cre-RE tras 8 horas de incubación en medio mínimo nitrato y presencia de $1 \mu M$ 4-OHT. **C.** Cuantificación del tamaño de los filamentos infectivos dependiendo de si muestran o no señal de fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación.

Los niveles de PKA caen abruptamente durante la formación del filamento infectivo.

Tomados en conjunto los resultados de los apartados anteriores son compatibles con la posibilidad de que en *U. maydis*, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, exista una relación positiva entre TORC1 y PKA, de tal manera que un aumento en la actividad TORC1 podría producir un aumento en la actividad PKA. Aunque sabemos que esto podría ocurrir con la mediación de las S6 kinasas, sin embargo, no hemos determinado los posibles detalles a nivel molecular.

Por otra parte, hemos comprobado que una alta actividad PKA parece interferir fuertemente con la capacidad para inducir un crecimiento fuertemente polarizado durante la formación del filamento infectivo, lo que está de acuerdo

con las observaciones descritas previamente acerca de la relación opuesta entre PKA y crecimiento polar en *U. maydis*.

Todo ello, nos llevo a la aparente paradoja de que en el filamento infectivo debería existir alta actividad PKA dado que existía un buen nivel de actividad TORC1 y esto, de alguna manera debería interferir con la potenciación del crecimiento polar, una de las consecuencias más notables de activar el programa de filamentación dependiente de *b*. Habíamos observado, en experimentos previos (Fig. 45B), que los niveles de transcripción del gen *adr1* disminuían durante la inducción del filamento infectivo. Ello nos llevo a plantearnos si una manera que podía existir, por parte de la célula, de solventar la paradoja descrita arriba, podría ser modulando los niveles de PKA. Por ello decidimos analizar los niveles de ARNm de *adr1* y *ubc1*, comparando estirpes capaces de producir un complejo b activo (AB33) frente a un control incapaz de ello (AB34). También construimos estirpes, en estos fondos genéticos, que portasen los alelos marcados con epítomos, *ubc1-3HA* y *GFP-adr1* y analizamos los niveles de proteína en condiciones de inducción de los genes *b*. Los resultados obtenidos (Fig. 49) indicaban claramente que hay una fuerte modulación negativa de los niveles de PKA durante la inducción del filamento infectivo, dependiente del complejo b.

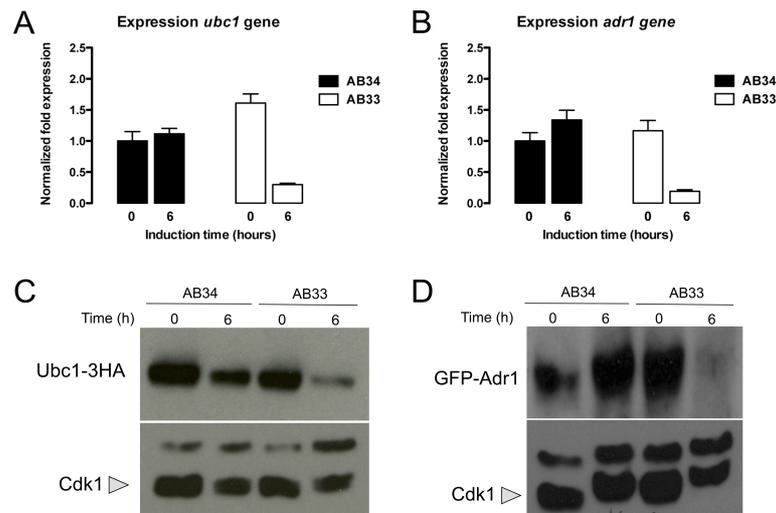


Fig. 49. Los niveles de los componentes de PKA están regulados negativamente por el complejo b. **A, B.** RT-PCR cuantitativa para *adr1* y *ubc1* en las estirpes indicadas. El ARN se aisló en los tiempos indicados tras la transferencia de las células a medio mínimo nitrato. Como control interno, se usó la expresión de *tub1*. Se tomó como valor de referencia la expresión en condiciones control (tiempo 0, AB34). Cada columna representa el valor medio de tres réplicas biológicas independientes. **C, D.** Niveles de proteína utilizando alelos marcados con epítomos de Ubc1 (Ubc1-3HA, AUM135) y Adr1 (GFP-Adr1, AUM135). Las cargas en cada gel se ajustaron usando como control los niveles de Cdk1 (utilizando un anticuerpo anti-PSTAIRE).

DISCUSIÓN

En el caso de las plantas, las mayores catástrofes son ocasionadas por los hongos, siendo los causantes del aproximadamente 70% de las pérdidas en las cosechas a nivel mundial (Strange and Scott, 2005). La infección de las plantas por estos organismos, requiere la formación de una estructura especializada denominada filamento infectivo, bien sea desde la espora o desde una etapa intermedia, la cual permitirá al hongo inspeccionar la superficie de la planta con el fin de determinar cual es la zona mas adecuada para penetrar en el interior del vegetal, ocasionado su infección y permitiendo al patógeno sobrevivir. Por tanto, dicha etapa es un periodo crítico durante la patogénesis de los parásitos invasores de plantas.

La formación y la función de esta estructura es altamente diversa entre los distintos hongos fitopatógenos, sin embargo su génesis en los diferentes hongos, implica algunas características comunes como es la necesidad de cambiar morfológicamente debido a la alteración de los patrones del crecimiento (polar frente a isotrópico), lo cual conlleva un reajuste tanto del ciclo celular como del metabolismo de la célula (Perez-Nadales et al., 2014). Es necesario destacar que el proceso de infección de las plantas por parte de los hongos fitopatógenos ocurre en respuesta a la falta de nutrientes, debido a que si el medio es rico en nutrientes estos organismos se mantienen en estado avirulento ya que el proceso de virulencia esta asociado con la necesidad de formar estructuras especializadas tales como la hifa infectiva, requiriendo un fuerte gasto energético para la célula como consecuencia de los fuertes cambios morfológicos que estos organismos han de sufrir y los reajustes celulares que ello conlleva.

El caso mejor aclarado es el de *Magnaporthe oryzae*, el cual genera la enfermedad denominada “tizón del arroz”. El proceso de infección de la planta del arroz por este hongo involucra la formación de una estructura especializada denominada “apresorio”, la cual generará un elevada presión de turgencia permitiendo al hongo romper la cutícula vegetal y penetrar en el interior de la planta hospedadora. La formación del apresorio comienza a partir de un conidio formado por tres células, donde dos de ellas se sacrificaran sirviendo como fuente donadora de nutrientes, vía autofagia, requiriendo que

durante la formación de dicha estructura la actividad TOR en dichas células ha de disminuir, con el fin de mantener un estado autofágico elevado (Marroquin-Guzman and Wilson, 2015; Marroquin-Guzman et al., 2017).

Por otra parte, la infección del maíz ocasionada por *Ustilago maydis* también requiere la formación de la estructura especializada denominada filamento infectivo, la cual permitirá al hongo reptar por la superficie de la planta en búsqueda del mejor sitio de penetración en el interior del vegetal. La formación de esta estructura ocurre como resultado del apareamiento de dos células haploides compatibles siendo el control de este proceso llevado a cabo por el locus de tipo sexual *b* y lo cual implica la existencia de un fuerte cambio morfológico, adquiriendo de este modo una única célula un volumen aproximadamente 5 veces superior al inicial. En esta tesis doctoral, se ha tratado de comprender que mecanismos son los responsables de la regulación de este aumento del volumen celular y como es llevada a cabo la regulación de dicho proceso. Un fuerte candidato ha llevar a cabo dicha regulación es la kinasa TOR ya que en otros organismos eucariotas se ha demostrado que dicha kinasa controla el tamaño celular.

En *U. maydis* únicamente existe una kinasa TOR, la cual es esencial y que también se encuentra alternando entre los dos complejos TORC1 y TORC2 como en organismos eucariotas superiores. Mientras que el complejo TORC2 no es esencial, su eliminación en células en estado vegetativo genera un ligero incremento en la longitud celular. Este dato puede ser explicado de varias formas, especulando una de ellas, quizá el incremento del tamaño celular que presentan las células carentes de actividad TORC2 pudiera ser debido a que exista un aumento en la actividad TORC1, dado que en *U. maydis* existe una única kinasa, normalmente repartida entre dos complejos, y en esta situación solo puede formar uno de ellos, de modo que la incapacidad para formar el complejo TORC2 puede traducirse en un incremento en la actividad TORC1 al verse favorecida la formación del complejo TORC1 y esto traducirse en un incremento del tamaño celular. Otra explicación, pudiera ser la existencia de una demora en la entrada en mitosis, debido a un retraso en la defosforilación de la ciclina Cdc2 (Cdk1) lo cual pudiera generar un incremento en la longitud

celular como ha sido demostrado en *S. pombe* (Wilkinson et al., 1999; Ikai et al., 2011). Por otra parte una tercera hipótesis es que en los mutantes del complejo TORC2 la relación entre actina, TORC1 y crecimiento celular se vea alterada generando defectos en la organización del citoesqueleto de actina ocasionando un incremento del volumen celular tal y como sucede en *S. cerevisiae* (Schmidt et al., 1996; Loewith, 2013).

Por otro lado, el complejo TORC1 si es esencial, siendo este un dato que no llama la atención dado que en el resto de organismo eucariotas el complejo TORC1 ha sido establecido como el regulador principal de los procesos de traducción de proteínas y transcripción de genes ribosomales, y por tanto de síntesis de proteínas. Es decir, este complejo a través de una modulación positiva de los procesos anabólicos y una modulación negativa de los procesos catabólicos permite a las células proliferar y crecer (Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018) y por tanto su esencialidad no llama la atención.

Dado que la kinasa TOR es quien controla el crecimiento, y que en *U. maydis* existe un fuerte incremento en el volumen celular durante la formación del filamento infectivo, nosotros hipotetizamos y posteriormente demostramos que esta kinasa es necesaria para la formación de dicha estructura infectiva, siendo además necesaria durante todo el proceso de filamentación, pudiéndose formar filamentos con una longitud intermedia cuando la kinasa es eliminada posteriormente en el tiempo durante el proceso de inducción del programa patogénico, y que la esencialidad de la kinasa para la filamentación, no es debida a la carga del programa patogénico *b*, el cual se activa de una forma correcta aún en carencia o inactivación de la kinasa TOR. Además, en este trabajo se ha mostrado que la formación del filamento infectivo no requiere del complejo TORC2, mostrando su delección incluso unos filamentos ligeramente mas largos que los de la estirpe control, pudiendo quizá este resultado ser argumentado porque las células de partida cuando el complejo TORC2 es delecionado son ligeramente mas largas que las de la estirpe control. Sin embargo, a través de la ablación genética del componente del complejo TORC1, Raptor1, conseguimos determinar que dicho complejo (TORC1) es requerido y fundamental para el proceso de filamentación y por tanto para la

formación del filamento infectivo, ejerciendo su función a través de sus dos sustratos S6K denominados Sch9 y Aga1, siendo ambos sustratos requeridos como pudimos observar al inactivarlos de forma simultanea.

Al comparar nuestros datos con la información conocida en otros organismos eucariotas, no llama la atención que el sustrato Sch9 sea necesario para el control del crecimiento celular, ya que por similitud de secuencia es la proteína homóloga a la S6K1 de mamíferos, Sch9 de *S. cerevisiae* y Psk1 de *S. pombe*, todas ellas descritas como necesarias para el crecimiento y proliferación celular (Jorgensen et al., 2002; Jacinto and Lorberg, 2008; Nakashima et al., 2012). Por el contrario, si llama la atención la necesidad de la proteína Aga1, la cual por similitud de secuencia se corresponde como proteína homóloga al sustrato del complejo TORC2 de *S. pombe* denominado Gad8, pero que en este trabajo nosotros hemos determinado que en *U. maydis* es sustrato de TORC1.

Esta adquisición de una S6K teóricamente del complejo TORC2 en otros organismos eucariotas por el complejo TORC1 durante la formación del filamento infectivo, puede sugerir un nuevo mecanismo de adaptación que *U. maydis* ha diseñado para poder sustentar el fuerte crecimiento polar requerido, con el fin de infectar la planta y de este modo sobrevivir y proliferar. De tal manera que la S6K denominada Aga1 pudiera ser el regulador central que este hongo ha elegido como nuevo mecanismo de adaptación para la resolver la paradoja de crecer en un ambiente hostil, donde se presume la existencia de una baja disponibilidad de nutrientes.

La paradoja radica en que estas condiciones ambientales hostiles se deberían traducirse a nivel molecular en una disminución de la actividad TORC1 del organismo, pero en este trabajo se ha demostrado que la formación de la hifa infectiva requiere de actividad TORC1 elevada, manteniéndose los niveles de TORC1 altos cuando el programa *b* esta activo. He aquí la paradoja, donde el hongo tiene que crecer cuando las condiciones para el regulador del crecimiento (TOR) son inadecuadas. Por tanto, esto sugiere que en este organismo pudieran existir dos alternativas: (i) *U. maydis* cuando activa el programa de infección se vuelve insensible a nutrientes. Esta alternativa no

parece ser adecuada ya que la formación del filamento infectivo se ve reducida cuando se dificulta la capacidad metabólica de asimilar el nitrato, al eliminar el gen que codifica para la nitrato reductasa (*nar1*), y por tanto de obtener Gln, ya que el nitrato finalmente es metabolizado a Gln. Al igual que sucede con la eliminación del componente que potencia la activación del complejo TORC1 denominado Gtr1, el cual en *S. cerevisiae* ha sido bien caracterizado y se encarga de percibir la disponibilidad del aminoácido Leu (Panchaud et al., 2013). En *U. maydis* al combinar ambas deleciones, la formación del filamento infectivo se ve truncada y este proceso es rescatado al añadir de nuevo al medio los aminoácidos Leu y Gln, lo cual sugiere que la activación del programa patogénico no hace que el hongo se vuelva insensible a la percepción de nutrientes, porque si se modifica dicha percepción la formación del filamento infectivo se ve alterada o truncada.

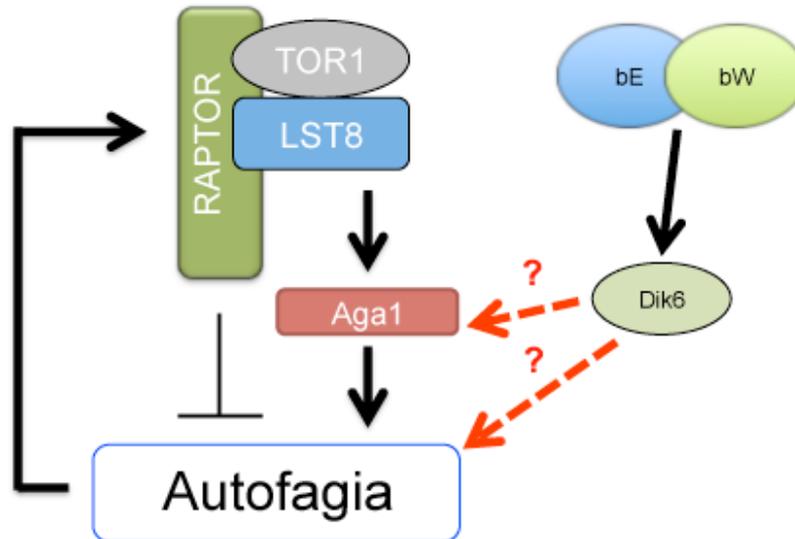
(ii) La otra alternativa es este organismo emplee una fuente interna de nutrientes que permitan mantener la actividad TORC1 elevada aún cuando las condiciones externas debieran generar la disminución de dicha actividad, siendo una posibilidad que estos nutrientes sean obtenidos vía autofagia. Esta opción parece bastante lógica si nosotros nos ponemos en el contexto de donde este organismo forma la estructura infectiva en la naturaleza, sobre la superficie de una hoja en la cual puede existir o no fuente de alimentación, siendo lo mas normal que la cantidad de nutrientes encontrada aquí sea escasa. Por ello, nosotros exploramos esta segunda posibilidad encontrando que la activación del programa *b* induce un incremento en la tasa autofágica, siendo esta autofagia además de tipo convencional (donde Atg1 desencadena su activación), TORC1 dependiente y sorprendentemente Aga1 dependiente y no Sch9 dependiente.

Por otro lado en este trabajo hemos demostrado que la activación del programa patogénico de *U. maydis* (que en la naturaleza en los patógenos vegetales ocurre en respuesta a ausencia de nutrientes) induce un incremento en la expresión del gen que codifica para la proteína Aga1, viéndose esta regulación reflejada en un incremento también en de los niveles de proteína. Además, también hemos visto la existencia de un ligero cambio en la movilidad de la

proteína, siendo este cambio por un lado dependiente de la actividad TORC1 y por otro lado dependiente de la activación del programa *b*, es decir la proteína Aga1 pudiera sufrir una doble fosforilación siendo una ejercida por la vía TORC1 y la otra cuando el complejo *b* esta activo, pudiendo esta ultima ser llevada a cabo por alguna kinasa (la cual aún no hemos sido capaces de identificar) cuya actividad este potenciada por la activación del complejo *b*.

De este modo, una hipótesis que estos datos pueden sugerir es que quizá, esta posible hiperfosforilación de la proteína Aga1 induzca su activación en respuesta a la estimulación del programa patogénico *b*, lo cual se traduce finalmente en un incremento de la tasa autofágica, conllevando por tanto la generación de nutrientes de una forma interna que permiten mantener la actividad TORC1 elevada durante la formación de la hifa infectiva. Adicionalmente, esta hipótesis se ve reforzada a través del resultado observado en este trabajo, donde la proteína Dik6, cuyo gen solo se expresa en respuesta a un programa *b* activo, de algún modo ayuda a la activación de la autofagia (su eliminación inhibe la autofagia observada en presencia del complejo *b* activo), de tal modo que la idea de que la activación del programa patogénico genera un incremento de la autofagia y que los nutrientes obtenidos de este proceso quizá sean los que ceban el sistema manteniendo la actividad TORC1 elevada con el fin de permitir la formación del filamento infectivo aún en condiciones nutricionales hostiles, se ve fortalecida, ya que dos proteínas que responden de diverso modo a una activación del programa infectivo *b* (Aga1 incrementa sus niveles y pudiera ser fosforilada de una forma *b* dependiente y Dik6 la cual solo esta presente en respuesta al programa *b*) generan como desenlace final un incremento en la tasa autofágica.

Por tanto, nosotros defendemos el modelo de la existencia de un bucle constante de retroalimentación autofagia-TOR cuando el programa patogénico se encuentra activo que concede al hongo la capacidad de poder crecer de una forma menos dependiente de las condiciones nutricionales externas, y por tanto en un ambiente hostil, nutricionalmente hablando, como puede ser la superficie de una hoja. (MODELO I).



Modelo I. Figura representativa de la hipótesis defendida en este trabajo, donde se representa que la activación del complejo implica un incremento del proceso catabólico de autofagia el cual genera nutrientes para mantener la actividad TORC1 elevada. Las flechas discontinuas rojas representan conexiones aún no establecidas.

Quizá, esta pueda ser la explicación de porque *U. maydis* ha adquirido un sustrato típico de TORC2 por TORC1 durante la formación del filamento infectivo pero el mecanismo molecular de cómo Aga1 puede estimular esta autofagia cuando el complejo *b* esta activo, aún lo desconocemos. Especulando posibilidades, una pudiera ser que quizá, Aga1 interaccione con Atg1 imposibilitando la asociación TORC1-Atg1, y por tanto la fosforilación inhibitoria que TORC1 pudiera ejercer sobre Atg1, como sucede en *D. melanogaste* y mamíferos (Chen and Klionsky, 2011). Esta hipótesis no parece ser acertada, ya que un aumento en los niveles de Aga1 no inducen un incremento en la autofagia en un fondo carente del programa *b* (FB1), aunque es una opción que aún no podemos descartar totalmente debido a que dicha asociación, Aga1-Atg1, pudiera requerir de una proteína Aga1 activa para ser llevada a cabo, y el hecho de únicamente aumentar los niveles de la proteína no implica que esta proteína este en estado activo, porque por ejemplo su activación quizá pudiera requerir la fosforilación anteriormente hipotetizada y que es dependiente de la activación del complejo *b*, de tal modo que dicho fondo genético (FB1, carente de complejo *b*) no permitiría su activación,

traduciéndose en la incapacidad de asociación con Atg1, y por tanto permitiendo que TORC1 pueda ejercer su función inhibitoria sobre Atg1.

Otra posibilidad, es que dado que Aga1 es una S6K, esta fosforile a Atg1 activándola y propiciando de este modo la autofagia.

Por otro lado, como el complejo *b* directamente desencadena la activación de la autofagia tampoco lo conocemos, teniendo como único resultado que en la activación de dicho proceso como consecuencia de un complejo *b* activo, podría estar implicada la proteína Dik6, la cual es una proteína de membrana que presenta siete hipotéticos dominios transmembrana, cuya expresión génica ocurre solamente tras la activación del programa patogénico y que nosotros hemos observado que localiza en endomembranas cerca de la proteína activadora del complejo TORC1 denominada Rheb1.

Con los datos obtenidos hasta el momento nosotros hipotetizamos, que un incremento en la actividad TORC1 debieran de favorecer la formación del filamento infectivo, llegándose a formar filamentos mas largos ó cuyo proceso de formación fuera mas rápido, debido a que el proceso de filamentación requiere actividad TORC1 junto con una autofagia activa. Por ello los mutantes $\Delta tsc2$ y $Rheb1^{K127R}$ deberían de formar el filamento infectivo mejor o mas rápido. El resultado obtenido fue realmente sorprendente, ya que un nivel de TORC1 demasiado elevado trunca la formación de dicha estructura a pesar de que el programa patogénico este correctamente activado. Este resultado tan llamativo, hizo que nos preguntáramos cual era su motivo. Como se ha demostrado en este trabajo, esto es debido a la regulación positiva que TORC1 ejerce sobre la ruta de PKA tal y como también se ha descrito en *S. cerevisiae* (Urban et al., 2007).

La ruta de PKA mientras que en otros organismo eucariotas como *S. cerevisiae* y *C. albicans* se encuentra activando el crecimiento polar (D'Souza and Heitman, 2001) en *U. maydis* su regulación es al contrario, siendo una potente inhibidora del crecimiento polar (Gold et al., 1994; Durrenberger et al., 1998). En esta tesis doctoral se ha demostrado que en *U. maydis* la regulación que TORC1 ejerce sobre PKA no es a nivel transcripcional, si no que es a nivel de

proteína, degradándose casi por completo la subunidad catalítica de PKA, ADR1, cuando el programa *b* está activo, permitiendo de este modo el fuerte crecimiento polar que este organismo sufre durante su etapa de infección. Por el contrario, cuando existe un exceso de actividad TORC1 dicha proteína no se degrada incluso cuando el programa *b* está activo, impidiéndose por tanto la formación del filamento infectivo. Esta imposibilidad de degradar la proteína cuando TORC1 es elevado quizá pudiera ser explicada porque exista una disminución en los niveles del proteasoma ya que en levaduras y mamíferos se ha descrito que la inactivación de TORC1, conduce a un incremento de dichos niveles (Chantranupong and Sabatini, 2016; Rousseau and Bertolotti, 2016), de tal modo, que es lógico pensar que una actividad elevada de TORC1 pudiera tener el efecto contrario. Una segunda opción, es que el nivel de autofagia en estos mutantes sea tan elevado que todo lo que crea lo destruye impidiendo por tanto el crecimiento de la célula.

Por tanto vuelve a existir una nueva paradoja, ya que la formación del filamento infectivo requiere actividad TORC1, pero a su vez dicha actividad regula de forma positiva a PKA, la cual es un potente inhibidor del crecimiento polar, por lo cual la cuestión es: ¿Cómo es posible la formación del filamento infectivo con actividad TORC1 elevada? la solución que este organismo ha puesto a esta segunda paradoja, radica en una regulación negativa a nivel transcripcional ejercida a través del complejo *b* sobre la expresión de los genes que codifican para las subunidades reguladora y catalítica de la ruta PKA. De tal modo, que dicha disminución parece ser suficientemente amortiguadora del exceso de actividad PKA que existe en la célula con motivo de tener un TORC1 hiperactivo. En *U. maydis*, nosotros demostramos que si la actividad TORC1 de las estirpes $\Delta tsc2$ y $Rheb1^{K127R}$ es parcialmente disminuida, mediante el uso de la droga rapamicina, la formación del filamento infectivo es recuperada, del mismo modo que sucede si en vez de bajar la actividad TORC1 se disminuye la actividad PKA, a través del incremento de la expresión de la subunidad reguladora negativa *ubc1*, ó eliminando la subunidad catalítica, ADR1. Por ello, la posibilidad anteriormente sugerida para explicar la incapacidad de formar el filamento infectivo por los mutantes hiperactivos de TORC1 sea debido al

exceso de autofagia y no a la relación con PKA se ve desfavorecida, ya que la formación del filamento infectivo es rescatada al disminuir la actividad PKA en los mutantes hiperactivos de TORC1.

Una especulación fisiológica para explicar el porque es necesaria la existencia de la regulación tan compleja entre TORC1-Aga1-PKA pudiera radicar en la importancia que tiene para la patogénesis de *U. maydis* la S6K Aga1. Siendo su presencia crucial durante la formación de la estructura especializada para la penetración en el interior del vegetal denominada apresorio, así mutantes de delección para esta proteína se muestran como avirulentos, siendo ello debido a la incapacidad que ellos presentan para la formación del apresorio, a pesar de que el programa genético que determina su formación se encuentre correctamente activado (Berndt et al., 2010). Por otro lado, para la formación del apresorio ha de existir otro fuerte cambio en las condiciones de crecimiento, pasando de crecer polarmente a tener que crecer isotrópicamente. Una posibilidad que nosotros especulamos es la posible existencia de un incremento en la actividad TORC1 en el momento de formar el apresorio, de tal modo que dicho aumento de la actividad TORC1 genera un fuerte aumento también de PKA, el cual actúa como un fuerte inhibidor del crecimiento polar en *U. maydis*, favoreciendo el crecimiento isotrópico necesario para la formación de esta estructura. Lo que sucede a continuación, nosotros hipotetizamos que ha de ser una disminución de la hiperactividad TORC1 para volver a crecer polarmente con el fin de ramificarse en el interior de la planta y poder colonizarla. Por tanto, una posibilidad que apoyaría esta hipótesis, sería que una hiperactivación de PKA en los mutantes avirulentos Aga1 rescataran la formación del apresorio y por tanto dejaran de comportarse como avirulentos ocasionando la enfermedad en el interior de la planta.

En definitiva, estos datos sugieren que *U. maydis* requiere una regulación muy fina y precisa, con el fin de generar una correcta modulación entre las rutas TORC1 y PKA, con el objetivo de llevar a cabo una adecuada filamentación que le permita al hongo buscar la zona adecuada para la penetración en el interior de la planta.

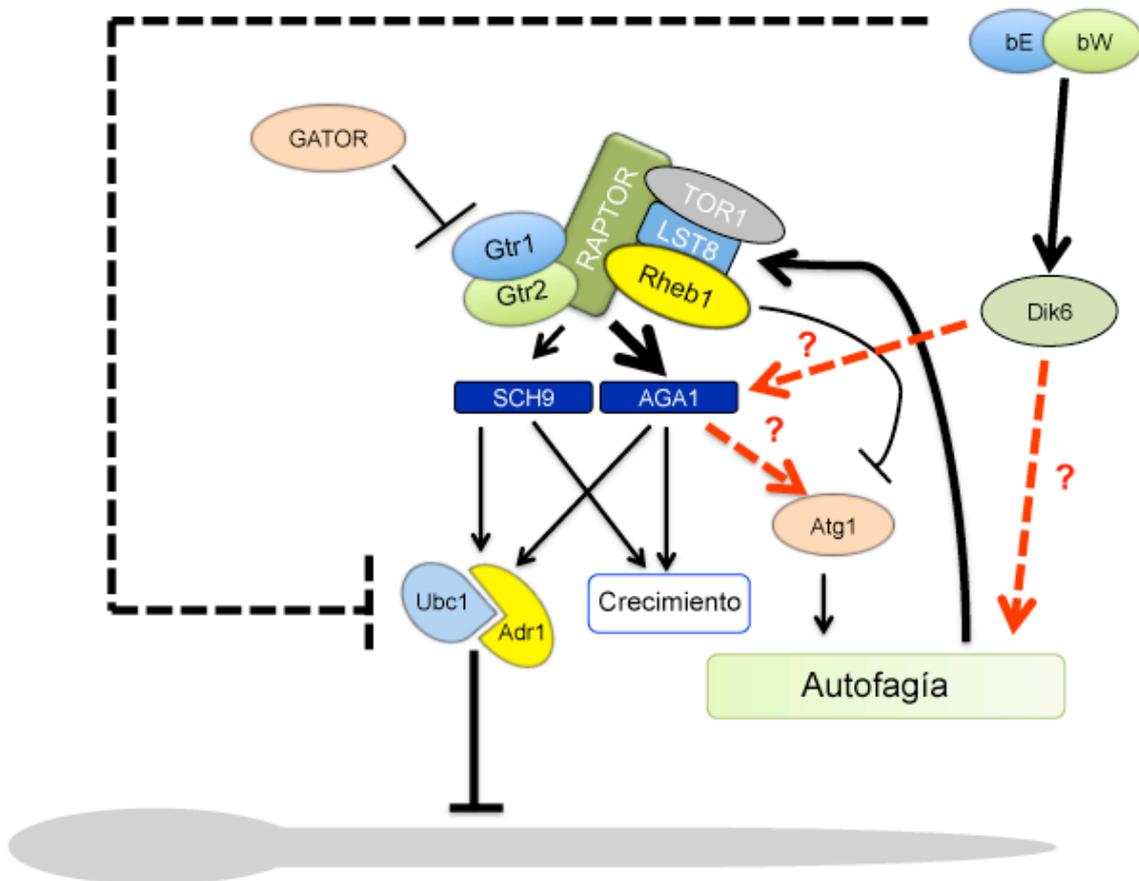
Para finalizar y haciendo un esfuerzo para poner todos los datos obtenidos en este trabajo en conjunto, un breve resumen es el siguiente.

Ustilago maydis ha de solventar dos grandes paradojas, la primera consiste en solucionar como poder crecer en condiciones limitantes de nutrientes. La formación del filamento infectivo ocurre en respuesta a la activación del programa de virulencia *b* y en la naturaleza esto sucede sobre la superficie de una hoja, donde se hipotetiza que la cantidad de nutrientes pudiera ser escasa. Por tanto, este organismo ha de hacerse de algún modo menos dependiente de la disponibilidad de nutrientes externos. Nosotros defendemos la hipótesis que ello lo consigue a través de la activación del proceso de autofagia, ya que esta autofagia es inducida cuando el programa infectivo se encuentra activo, estando implicadas proteínas reguladas por el complejo *b* como son Dik6 y Aga1. Así estos nutrientes permiten cebar el complejo TORC1, manteniéndolo activo para sustentar la formación de la hifa infectiva (al activar las S6K requeridas para ello, Sch9 y Aga1) y seguir activando la autofagia. De este modo nosotros argumentamos la posibilidad de la existencia de un posible bucle de retroalimentación entre ambos procesos, el cual permite mantener activo el complejo regulador del crecimiento TORC1 aún a pesar de que las señales nutricionales externas le indicarían que debiera apagarse, siendo esto traducido a nivel celular como un permiso de crecimiento aún en condiciones nutricionales no óptimas. Así esta es una alternativa que *U. maydis* pudiera emplear para resolver la primera paradoja y permitir al hongo crecer y reptar por la superficie de la hoja hasta encontrar el sitio de penetración en el interior de la planta.

La segunda paradoja radica en que ha de existir una regulación muy fina y precisa en el control de los niveles de TORC1 activo, ya que la existencia de un exceso de actividad TORC1 genera una elevada actividad PKA, la cual es un potente inhibidor del crecimiento polar en este organismo. Esta segunda paradoja *U. maydis*, la ha resuelto mediante una inhibición a nivel transcripcional ejercida sobre la ruta de PKA por el complejo *b*, de tal modo que

dicha inhibición disminuye los niveles de PKA a unos límites adecuados que permiten la formación del filamento infectivo inducido por *b*. (MODELO II).

Por tanto todo este trabajo, puede ser resumido en la frase siguiente: “*Ustilago maydis* ha diseñado una red de conexiones complejas que le permiten sustentar un fuerte crecimiento polar en unas condiciones no óptimas, con el fin de adaptarse y responder mejor al cambio y de este modo poder sobrevivir como especie”



Modelo II. Figura representativa del modelo final defendido en este trabajo. La activación del complejo implica un incremento de la autofagia generando nutrientes que permiten mantener la actividad TORC1 elevada, ocasionando la activación de las proteínas S6K y generando un incremento del crecimiento celular, autofagia y permitiendo el crecimiento polar. Las flechas discontinuas rojas representan conexiones aún no establecidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramburu, J., Ortells, M.C., Tejedor, S., Buxade, M., and Lopez-Rodriguez, C.** (2014). Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Sci Signal* **7**, re2.
- Baker, K., Kirkham, S., Halova, L., Atkin, J., Franz-Wachtel, M., Cobley, D., Krug, K., Macek, B., Mulvihill, D.P., and Petersen, J.** (2016). TOR complex 2 localises to the cytokinetic actomyosin ring and controls the fidelity of cytokinesis. *J Cell Sci* **129**, 2613-2624.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W., and Spanos, A.** (1993). The *Ustilago maydis* *nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., and Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M.** (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* **340**, 1100-1106.
- Barnes, C.W., Szabo, L.J., May, G., and Groth, J.V.** (2004). Inbreeding levels of two *Ustilago maydis* populations. *Mycologia* **96**, 1236-1244.
- Bastidas, R.J., and Cardenas, M.E.** (2010). Chapter 11 - TORC1 Signaling in the Budding Yeast Endomembrane System and Control of Cell,ÀCell Adhesion in Pathogenic Fungi. In *The Enzymes* (Academic Press), pp. 199-227.
- Bastidas, R.J., Heitman, J., and Cardenas, M.E.** (2009). The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000294.
- Berndt, P., Lanver, D., and Kahmann, R.** (2010). The AGC Ser/Thr kinase Aga1 is essential for appressorium formation and maintenance of the actin cytoskeleton in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **78**, 1484-1499.
- Binda, M., Peli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., and De Virgilio, C.** (2009). The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell* **35**, 563-573.
- Blancquaert, S., Wang, L., Paternot, S., Coulonval, K., Dumont, J.E., Harris, T.E., and Roger, P.P.** (2010). cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4. *Mol Endocrinol* **24**, 1453-1468.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., Konig, J., Julius, C., and Feldbrugge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.

- Chantranupong, L., and Sabatini, D.M.** (2016). Cell biology: The TORC1 pathway to protein destruction. *Nature* **536**, 155-156.
- Chantranupong, L., Wolfson, R.L., Orozco, J.M., Saxton, R.A., Scaria, S.M., Bar-Peled, L., Spooner, E., Isasa, M., Gygi, S.P., and Sabatini, D.M.** (2014). The Sestrins interact with GATOR2 to negatively regulate the amino-acid-sensing pathway upstream of mTORC1. *Cell Rep* **9**, 1-8.
- Chen, D., Wang, Y., Zhou, X., and Xu, J.R.** (2014). The Sch9 kinase regulates conidium size, stress responses, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **9**, e105811.
- Chen, Y., and Klionsky, D.J.** (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* **124**, 161-170.
- Chia, K.H., Fukuda, T., Sofyantor, F., Matsuda, T., Amai, T., and Shiozaki, K.** (2017). Ragulator and GATOR1 complexes promote fission yeast growth by attenuating TOR complex 1 through Rag GTPases. *Elife* **6**.
- Chowdhury, T., and Kohler, J.R.** (2015). Ribosomal protein S6 phosphorylation is controlled by TOR and modulated by PKA in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **98**, 384-402.
- Codogno, P., and Meijer, A.J.** (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1509-1518.
- Cui, D., Xiong, X., and Zhao, Y.** (2016). Cullin-RING ligases in regulation of autophagy. *Cell Div* **11**, 8.
- D'Souza, C.A., and Heitman, J.** (2001). Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 349-364.
- De Virgilio, C., and Loewith, R.** (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1476-1481.
- Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L.** (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851-865.
- Dibble, C.C., and Cantley, L.C.** (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* **25**, 545-555.
- Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., and Manning, B.D.** (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell* **47**, 535-546.
- Djouder, N., Tuerk, R.D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R.F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R.A., Viollet, B., Makela, T.P., Wallimann, T., Neumann, D., and Krek, W.** (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. *Embo J* **29**, 469-481.
- Du, W., Halova, L., Kirkham, S., Atkin, J., and Petersen, J.** (2012). TORC2 and the AGC kinase Gad8 regulate phosphorylation of the ribosomal protein S6 in fission yeast. *Biol Open* **1**, 884-888.
- Durrenberger, F., Wong, K., and Kronstad, J.W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5684-5689.
- Efeyan, A., Zoncu, R., Chang, S., Gumper, I., Snitkin, H., Wolfson, R.L., Kirak, O., Sabatini, D.D., and Sabatini, D.M.** (2013). Regulation of mTORC1 by the

- Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* **493**, 679-683.
- Feldbrugge, M., Kamper, J., Steinberg, G., and Kahmann, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J.** (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* **16**, 1472-1487.
- Flor-Parra, I., Castillo-Lluva, S., and Perez-Martin, J.** (2007). Polar growth in the infectious hyphae of the phytopathogen *Ustilago maydis* depends on a virulence-specific cyclin. *Plant Cell* **19**, 3280-3296.
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kamper, J., and Perez-Martin, J.** (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.
- Freitag, J., Lanver, D., Bohmer, C., Schink, K.O., Bolker, M., and Sandrock, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **7**, e1002044.
- Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X.** (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284**, 12297-12305.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., and Perez-Martin, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Gaubitz, C., Oliveira, T.M., Prouteau, M., Leitner, A., Karuppasamy, M., Konstantinidou, G., Rispal, D., Eltschinger, S., Robinson, G.C., Thore, S., Aebersold, R., Schaffitzel, C., and Loewith, R.** (2015). Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Mol Cell* **58**, 977-988.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K., and Kronstad, J.** (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**, 2805-2816.
- Gonzalez, A., and Hall, M.N.** (2017). Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *Embo J* **36**, 397-408.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F., and Kahmann, R.** (1999). Environmental Signals Controlling Sexual Development of the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*; through the Transcriptional Regulator Prf1. *Plant Cell* **11**, 1293.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., and Kamper, J.** (2010). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.

- Hoffman, C.S., and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Huang, J., and Manning, B.D.** (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* **412**, 179-190.
- Ikai, N., Nakazawa, N., Hayashi, T., and Yanagida, M.** (2011). The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biol* **1**, 110007.
- Jacinto, E., and Lorberg, A.** (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **410**, 19-37.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breitskreutz, B.J., and Tyers, M.** (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**, 395-400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M.** (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* **18**, 2491-2505.
- Kama, R., Robinson, M., and Gerst, J.E.** (2007). Btn2, a Hook1 ortholog and potential Batten disease-related protein, mediates late endosome-Golgi protein sorting in yeast. *Mol Cell Biol* **27**, 605-621.
- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y.** (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* **25**, 7239-7248.
- Kamper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kannan, N., Haste, N., Taylor, S.S., and Neuwald, A.F.** (2007). The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1272-1277.
- Kim, E.** (2009). Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract* **3**, 64-71.

- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L.S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N., and Kahmann, R. (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol* **15**, 409-421.
- Larraya, L.M., Boyce, K.J., So, A., Steen, B.R., Jones, S., Marra, M., and Kronstad, J.W. (2005). Serial analysis of gene expression reveals conserved links between protein kinase A, ribosome biogenesis, and phosphate metabolism in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 2029-2043.
- Lee, J., Moir, R.D., and Willis, I.M. (2009). Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J Biol Chem* **284**, 12604-12608.
- Lewis, C.M., and Fincham, J.R. (1970). Regulation of nitrate reductase in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *J Bacteriol* **103**, 55-61.
- Liu, Q., Kang, S.A., Thoreen, C.C., Hur, W., Wang, J., Chang, J.W., Markhard, A., Zhang, J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2012a). Development of ATP-competitive mTOR inhibitors. *Methods Mol Biol* **821**, 447-460.
- Liu, W., Zhao, J., Li, X., Li, Y., and Jiang, L. (2010). The protein kinase CaSch9p is required for the cell growth, filamentation and virulence in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **10**, 462-470.
- Liu, X.H., Gao, H.M., Xu, F., Lu, J.P., Devenish, R.J., and Lin, F.C. (2012b). Autophagy vitalizes the pathogenicity of pathogenic fungi. *Autophagy* **8**, 1415-1425.
- Loewith, R. (2013). Growth control: function follows form. *Curr Biol* **23**, R607-609.
- Lopez-Berges, M.S., Rispail, N., Prados-Rosales, R.C., and Di Pietro, A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* **22**, 2459-2475.
- Luo, Y., and Wang, L. (2017). Discovery and Development of ATP-Competitive mTOR Inhibitors Using Computational Approaches. *Curr Pharm Des* **23**, 4321-4331.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., and Bolker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-578.
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14315-14322.
- Marroquin-Guzman, M., and Wilson, R.A. (2015). GATA-Dependent Glutaminolysis Drives Appressorium Formation in *Magnaporthe oryzae* by Suppressing TOR Inhibition of cAMP/PKA Signaling. *PLoS Pathog* **11**, e1004851.
- Marroquin-Guzman, M., Sun, G., and Wilson, R.A. (2017). Glucose-ABL1-TOR Signaling Modulates Cell Cycle Tuning to Control Terminal Appressorial Cell Differentiation. *PLoS Genet* **13**, e1006557.
- Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *Embo J* **22**, 3073-3083.

- Mavrakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C.A., and Bossis, I.** (2006). Depletion of type IA regulatory subunit (RIalpha) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Hum Mol Genet* **15**, 2962-2971.
- Meyuhas, O.** (2008). Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. *International Review of Cell and Molecular Biology* **268**, 1-37.
- Michels, A.A., Robitaille, A.M., Buczynski-Ruchonnet, D., Hodroj, W., Reina, J.H., Hall, M.N., and Hernandez, N.** (2010). mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. *Mol Cell Biol* **30**, 3749-3757.
- Mielnichuk, N., Sgarlata, C., and Perez-Martin, J.** (2009). A role for the DNA-damage checkpoint kinase Chk1 in the virulence program of the fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **122**, 4130-4140.
- Mudholkar, K., Fitzke, E., Prinz, C., Mayer, M.P., and Rospert, S.** (2017). The Hsp70 homolog Ssb affects ribosome biogenesis via the TORC1-Sch9 signaling pathway. *Nat Commun* **8**, 937.
- Nadal, M., and Gold, S.E.** (2010). The autophagy genes ATG8 and ATG1 affect morphogenesis and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Plant Pathol* **11**, 463-478.
- Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., and Tamanoi, F.** (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *J Cell Sci* **125**, 5840-5849.
- Nasr, A.B., Ponnala, D., Sagurthi, S.R., Kattamuri, R.K., Marri, V.K., Gudala, S., Lakkaraju, C., Bandaru, S., and Nayarisseri, A.** (2015). Molecular Docking studies of FKBP12-mTOR inhibitors using binding predictions. *Bioinformatics* **11**, 307-315.
- Nicastro, R., Sardu, A., Panchaud, N., and De Virgilio, C.** (2017). The Architecture of the Rag GTPase Signaling Network. *Biomolecules* **7**.
- Niles, B.J., and Powers, T.** (2014). TOR complex 2-Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **25**, 3962-3972.
- Niles, B.J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A., and Powers, T.** (2012). Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1536-1541.
- Noda, T.** (2017). Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules* **7**.
- Noda, T., and Ohsumi, Y.** (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **273**, 3963-3966.
- Oler, A.J., and Cairns, B.R.** (2012). PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *Embo J* **31**, 1440-1452.
- Otsubo, Y., and Yamamoto, M.** (2008). TOR signaling in fission yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**, 277-283.
- Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., and Yamashita, A.** (2017). TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules* **7**.
- Panchaud, N., Peli-Gulli, M.P., and De Virgilio, C.** (2013). Amino acid deprivation inhibits TORC1 through a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr1. *Sci Signal* **6**, ra42.

- Perez-Martin, J.** (2012). Cell cycle and morphogenesis connections during the formation of the infective filament in *Ustilago maydis*. In *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*, J. Perez-Martin and A. di Pietro, eds (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 97-114.
- Perez-Martin, J., Bardetti, P., Castanheira, S., de la Torre, A., and Tenorio-Gomez, M.** (2016). Virulence-specific cell cycle and morphogenesis connections in pathogenic fungi. *Semin Cell Dev Biol* **57**, 93-99.
- Perez-Martin, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J., and Carbo, N.** (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics* **276**, 211-229.
- Perez-Nadales, E., Nogueira, M.F., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., Lengeler, K., Marchegiani, E., Mehrotra, P.V., Moretti, M., Naik, V., Oses-Ruiz, M., Oskarsson, T., Schafer, K., Wasserstrom, L., Brakhage, A.A., Gow, N.A., Kahmann, R., Lebrun, M.H., Perez-Martin, J., Di Pietro, A., Talbot, N.J., Toquin, V., Walther, A., and Wendland, J.** (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol* **70**, 42-67.
- Perez-Perez, M.E., Couso, I., Heredia-Martinez, L.G., and Crespo, J.L.** (2017). Monitoring Autophagy in the Model Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells* **6**.
- Powis, K., and De Virgilio, C.** (2016). Conserved regulators of Rag GTPases orchestrate amino acid-dependent TORC1 signaling. *Cell Discov* **2**, 15049.
- Powis, K., Zhang, T., Panchaud, N., Wang, R., De Virgilio, C., and Ding, J.** (2015). Crystal structure of the Ego1-Ego2-Ego3 complex and its role in promoting Rag GTPase-dependent TORC1 signaling. *Cell Res* **25**, 1043-1059.
- Rabanal-Ruiz, Y., and Korolchuk, V.I.** (2018). mTORC1 and Nutrient Homeostasis: The Central Role of the Lysosome. *Int J Mol Sci* **19**.
- Rousseau, A., and Bertolotti, A.** (2016). An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **536**, 184-189.
- Saliba, E., Evangelinos, M., Gournas, C., Corrillon, F., Georis, I., and Andre, B.** (2018). The yeast H(+)-ATPase Pma1 promotes Rag/Gtr-dependent TORC1 activation in response to H(+)-coupled nutrient uptake. *Elife* **7**.
- Sancak, Y., and Sabatini, D.M.** (2009). Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem Soc Trans* **37**, 289-290.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M.** (2010). Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M.** (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496-1501.
- Sanchez-Martinez, C., and Perez-Martin, J.** (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**, 214-221.
- Saxton, R.A., and Sabatini, D.M.** (2017a). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976.
- Saxton, R.A., and Sabatini, D.M.** (2017b). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **169**, 361-371.

- Schirawski, J., Bohnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., and Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schmidt, A., Kunz, J., and Hall, M.Ä.** (1996). TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13780-13785.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Scott, R.C., Juhasz, G., and Neufeld, T.P.** (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* **17**, 1-11.
- Shertz, C.A., Bastidas, R.J., Li, W., Heitman, J., and Cardenas, M.E.** (2010). Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics* **11**, 510.
- Shimobayashi, M., and Hall, M.N.** (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 155-162.
- Soulard, A., Cohen, A., and Hall, M.N.** (2009). TOR signaling in invertebrates. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 825-836.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., Jenö, P., and Hall, M.N.** (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* **21**, 3475-3486.
- Steinberg, G., and Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-67.
- Stephan, J.S., Yeh, Y.Y., Ramachandran, V., Deminoff, S.J., and Herman, P.K.** (2010). The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **6**, 294-295.
- Strange, R.N., and Scott, P.R.** (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 83-116.
- Tatebe, H., and Shiozaki, K.** (2017). Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules* **7**.
- Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J.** (2003). Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb. *Current Biology* **13**, 1259-1268.
- Terfruchte, M., Joehnk, B., Fajardo-Somera, R., Braus, G.H., Riquelme, M., Schipper, K., and Feldbrugge, M.** (2014). Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol* **62**, 1-10.
- Ukai, H., Araki, Y., Kira, S., Oikawa, Y., May, A.I., and Noda, T.** (2018). Gtr/Ego-independent TORC1 activation is achieved through a glutamine-sensitive interaction with Pib2 on the vacuolar membrane. *PLoS Genet* **14**, e1007334.

- Unkles, S.E., Wang, R., Wang, Y., Glass, A.D., Crawford, N.M., and Kinghorn, J.R.** (2004). Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. *J Biol Chem* **279**, 28182-28186.
- Urano, J., Tabancay, A.P., Yang, W., and Tamanoi, F.** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein is involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake. *J Biol Chem* **275**, 11198-11206.
- Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., and Tamanoi, F.** (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3514-3519.
- Urano, J., Comiso, M.J., Guo, L., Aspuria, P.J., Deniskin, R., Tabancay, A.P., Jr., Kato-Stankiewicz, J., and Tamanoi, F.** (2005). Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast. *Mol Microbiol* **58**, 1074-1086.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N., and Loewith, R.** (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**, 663-674.
- Valbuena, N., Guan, K.L., and Moreno, S.** (2012). The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *J Cell Sci* **125**, 1920-1928.
- van Dam, T.J., Zwartkruis, F.J., Bos, J.L., and Snel, B.** (2011). Evolution of the TOR pathway. *J Mol Evol* **73**, 209-220.
- van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., van den Ouweland, A., Reuser, A., Sampson, J., Halley, D., and van der Sluijs, P.** (1998). Interaction Between Hamartin and Tuberin, the TSC1 and TSC2 Gene Products. *Hum Mol Genet* **7**, 1053-1057.
- Varlakhanova, N.V., Mihalevic, M.J., Bernstein, K.A., and Ford, M.G.J.** (2017). Pib2 and the EGO complex are both required for activation of TORC1. *J Cell Sci* **130**, 3878-3890.
- Wei, Y., Tsang, C.K., and Zheng, X.F.** (2009). Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *Embo J* **28**, 2220-2230.
- Wilkinson, M.G., Pino, T.S., Tournier, S., Buck, V., Martin, H., Christiansen, J., Wilkinson, D.G., and Millar, J.B.** (1999). Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *Embo J* **18**, 4210-4221.
- Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H.J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., and Pavletich, N.P.** (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature* **552**, 368-373.
- Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., Boone, C., Ammerer, G., Baranov, P.V., and Loewith, R.** (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **27**, 397-409.
- Yu, F., Gu, Q., Yun, Y., Yin, Y., Xu, J.R., Shim, W.B., and Ma, Z.** (2014). The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*. *New Phytol* **203**, 219-232.
- Yuan, H.X., and Guan, K.L.** (2016). Structural insights of mTOR complex 1. *Cell Res* **26**, 267-268.

Zinzalla, V., and Hall, M.N. (2008). Signal transduction: Linking nutrients to growth. *Nature* **454**, 287-288.