

Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

2017

Análisis mutacional del transportador de purinas PhU de *Phanerochaete chrysosporium*

Bach. Juliette Dourron

Tutora: Dra. Gianna Cecchetto

Co-tutora: Mag. Mariana Barraco Vega

Laboratorio de Microbiología, Instituto de Química Biológica,
Facultad de Ciencias-Facultad de Química

Resumen

Las purinas son compuestos nitrogenados esenciales para la célula, componen ácidos nucleicos, algunos aminoácidos y coenzimas, participan en el metabolismo energético (ATP, GTP) y son fuente de nitrógeno para muchos organismos. El transporte de purinas es mediado por transportadores sustrato-específicos. Todos los transportadores conocidos, desde bacterias a mamíferos y plantas, pertenecen a tres familias conservadas (NCS1, NAT/NCS2 y AzgA-like).

El basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium* tiene dos transportadores de purinas: PhU (NAT) y PhZ (AzgA-like). *phU* se regula transcripcionalmente como los homólogos caracterizados: se induce por sustratos y cuando estos son fuente de nitrógeno se induce además por carencia de nitrógeno y se reprime por amonio. Ambos transportadores fueron caracterizados por nuestro grupo determinando que PhU transporta ácido úrico y xantina.

En este trabajo con el objetivo de caracterizar algunos residuos determinantes de la función del transportador PhU, se generaron mutantes y se expresaron en igual contexto genético: en una cepa de *Aspergillus nidulans* carente de transportadores propios, por lo tanto sin la capacidad de crecer utilizando purinas como fuente de nitrógeno. Los residuos a mutagenizar se seleccionaron a partir de la comparación con UapA (transportador de ácido úrico y xantina de *A. nidulans*) mediante análisis de secuencias y estructuras tridimensionales (modelo PhU y cristal UapA). Una vez seleccionadas y verificadas las cepas transformadas con cada mutación, se analizó la funcionalidad del transportador PhU, silvestre y mutantes, respecto al transporte de sustratos por crecimiento y a su localización subcelular lo que da un indicio del plegamiento de la proteína y su tránsito hacia la membrana.

Se construyeron 7 cepas portadoras de la mutación A120Q y 3 de P546G, y se verificó que todas tienen una única copia del gen *phU*. Las 7 cepas A120Q presentan la mutación adicional E569G. Estos doble-mutantes A120Q- E569G, se localizan en membrana y no muestran diferencias en el transporte respecto a PhU WT. El modelo estático de la estructura tridimensional de PhU, muestra que estos residuos se encuentran alejados entre sí, por lo que es probable que se trate de mutaciones silenciosas y no mutaciones supresoras intragénicas. Se determinó que Pro456 es clave para su estructura ya que su sustitución por glicina impide la colocación de la proteína en la membrana lo que se refleja en el análisis de transporte porque estas cepas no son capaces de transportar ácido úrico.

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
1.1. Metabolismo del nitrógeno en hongos.....	5
1.2. Metabolismo de las purinas.....	5
1.3. Degradación de las purinas en <i>Aspergillus nidulans</i>	6
1.4. Transportadores de bases nucleotídicas en hongos.....	7
1.5. Regulación transcripcional de los transportadores de purinas.....	8
1.6. Regulación post-traducciona l de los transportadores de purinas.....	9
1.7. Relaciones estructura-función en UapA.....	11
1.8. Transportadores de purinas en <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13
1.9. Similitudes y diferencias entre UapA (<i>A. nidulans</i>) y PhU (<i>P. chrysosporium</i>)...	14
2. Objetivo y estrategias.....	17
2.1. Objetivo.....	17
2.2. Estrategia.....	17
2.2.1. Construcción de cepas portadoras de transportadores mutantes.....	18
2.2.2. Análisis de transportadores mutados.....	21
3. Resultados y discusión.....	22
3.1. Construcción de <i>cassettes</i>	22
3.1.1. Construcción de <i>cassettes</i> por mutagénesis sito dirigida.....	22
3.1.2. Construcción del <i>cassette</i> de <i>uapA</i>	26
3.2. Transformación de la cepa <i>A. nidulans</i> (<i>uapA</i> ⁻ , <i>uapC</i> ⁻ , <i>azgA</i> ⁻) con los <i>cassettes</i> obtenidos.....	27
3.3. Análisis de los transformantes.....	28
3.3.1. Selección de los transformantes.....	28
3.3.2. Verificación de secuencia.....	29
3.3.3. Determinación del número de copias del gen.....	31
3.3.4. Análisis de transporte: Test de crecimiento.....	33
3.3.5. Localización subcelular de los transportadores: Microscopía de fluorescencia.....	35
4. Discusión de resultados y conclusiones.....	37

5. Perspectivas.....	38
6. Materiales y métodos.....	42
6.1. Cepas de <i>A. nidulans</i>	42
6.2. <i>Primers</i>	44
6.3. Vectores.....	46
6.4. Construcción de <i>cassettes</i>	46
6.4.1. Mutagénesis sitio dirigida.....	47
6.4.2. Construcción del <i>cassette</i> de <i>uapA</i>	48
6.4.3. <i>Restriction-free cloning</i>	49
6.5. Medios y soluciones para <i>A. nidulans</i>	53
6.5.1. Medios de cultivo.....	53
6.5.2. Suplementos para <i>A. nidulans</i>	55
6.6. Transformación de <i>A. nidulans</i>	55
6.6.1. Producción de protoplastos.....	56
6.6.2. Transformación.....	56
6.7. Purificación de los transformantes.....	57
6.8. Extracción de ADN de <i>A. nidulans</i>	57
6.9. Secuenciación de los transformantes.....	58
6.9.1. Amplificación de fragmentos a secuenciar.....	58
6.10. Análisis de las secuencias.....	58
6.11. Determinación del número de copias del gen mediante PCR en tiempo real.....	58
6.12. Análisis del transporte: Test de crecimiento.....	59
6.12.1. Placa maestra.....	59
6.12.2. Réplicas.....	59
6.13. Localización subcelular: Microscopía de fluorescencia.....	60
6.14. Almacenamiento de las cepas obtenidas.....	60
7. Bibliografía.....	61
8. Anexo.....	69

1. Introducción

1.1 Metabolismo del nitrógeno en hongos

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida de todo organismo; se encuentra formando parte de la mayoría de las macromoléculas de gran importancia funcional y estructural. Los hongos pueden usar una gran variedad de compuestos como fuente de nitrógeno, nitratos, nitritos, purinas, amidas, amino ácidos e incluso proteínas. El amonio y la glutamina son las fuentes preferidas o fuentes primarias. Dado la importancia del nitrógeno, los seres vivos poseen vías alternativas de obtención del mismo cuando las fuentes primarias de éste no se encuentran disponibles en el medio o se encuentran en concentraciones muy bajas que limitan el crecimiento. La utilización de purinas como fuente de nitrógeno implica la síntesis de los transportadores específicos de las mismas para su ingreso al organismo, así como las enzimas que las catabolizan hasta la obtención de una forma utilizable de nitrógeno. La expresión de los genes implicados en la maquinaria necesaria para la utilización de fuentes secundarias depende de la presencia de las mismas y también depende de la ausencia de una fuente primaria. Si se encuentra en el medio una fuente primaria no se activarán las vías secundarias por más que se encuentre presente en el medio la fuente secundaria (Marzluf, 1997; Wong *et al.*, 2008).

1.2 Metabolismo de las purinas

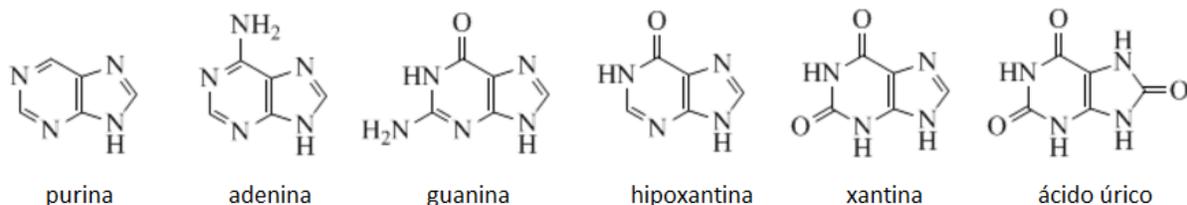


Figura 1. Estructura de las purinas. Extraído y modificado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Purine> el día 04/11/2016.

Las purinas son compuestos orgánicos, formados por dos anillos fusionados, uno de seis carbonos y otro de cinco (heterocíclico aromático). Estos anillos presentan un total de cuatro nitrógenos (Figura 1). Las purinas se encuentran en las células formando parte de los ácidos nucleicos, en forma de ATP y GTP, y algunas son utilizadas para la síntesis de aminoácidos y coenzimas (Vogels & Van der Drift, 1976). Existen tres vías en el metabolismo de las purinas, la vía de síntesis *de novo*, la vía de recuperación y la vía catabólica, o de degradación. El ciclo de las purinas permite equilibrar las cantidades de cada metabolito y también la degradación de

las mismas como mecanismo de eliminación u obtención de nitrógeno. La actividad de las enzimas del ciclo se encuentra regulada en base a las necesidades energéticas y de metabolitos de la célula (Manfredi & Holmes, 1984). El compuesto final obtenido como resultado de la vía de degradación de las purinas varía según el organismo. En una gran cantidad de microorganismos el producto final es amonio, el cual no se almacena ni se excreta ya que puede ser utilizado como fuente de nitrógeno (Vogels & Van der Drift, 1976).

1.3 Degradación de las purinas en *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente al *phylum* Ascomycota, ha sido usado desde hace más de 60 años como sistema modelo de estudio debido a su práctica manipulación en el laboratorio, a que presenta la capacidad de utilizar una gran variedad de nutrientes, que presenta un fenotipo visible para estudios de crecimiento y a su fácil manipulación genética. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, al ser un organismo extensamente estudiado se conocen en detalle muchas de sus vías metabólicas y los genes que las regulan (Mac Cabe *et al.* 2001).

La vía de degradación de las purinas en *A. nidulans* (Figura 2) es una de las vías metabólicas mejor caracterizadas gracias al aislamiento de mutantes de pérdida de función en cada etapa de la vía, permitiendo identificar las enzimas responsables y los genes que las codifican (Darlington *et al.*, 1965; Scazzocchio & Darlington, 1968; Scazzocchio *et al.*, 1982; Scazzocchio, 1994; Gournas *et al.* 2011).

La adenina es hidrolizada en hipoxantina y amonio por la enzima adenina desaminasa, que es codificada por el gen *nadA* (Ribard *et al.*, 2003). La hipoxantina es hidrolizada en xantina y la xantina en ácido úrico por la enzima xantina deshidrogenasa o purina hidroxilasa I, codificada por el gen *hxA* (Glatigny & Scazzocchio, 1995). La purina hidroxilasa II, codificada por el gen *hxnS*, también convierte la hipoxantina en xantina pero no actúa sobre la xantina (Lewis *et al.*, 1978). Estas dos enzimas requieren un cofactor codificado por el producto del gen *hxB* (Amrani *et al.*, 1999). Existe una vía alternativa para la conversión de xantina a ácido úrico mediante la enzima xantina dioxigenasa, codificada por el gen *xanA* (Cultrone *et al.*, 2007). La oxidación de ácido úrico a alantoína requiere tres enzimas, la urato oxidasa codificada por el gen *uaZ* (Oestreicher & Scazzocchio, 1993; Oestreicher *et al.*, 1993), la HIU hidrolasa codificada por el gen *uaX* y la OHCU descarboxilasa codificada por el gen *uaW* (Gournas *et al.*, 2011). La alantoína es convertida a ácido alantoico mediante la alantoinasa, codificada por el gen *alX*. El ácido alantoico es convertido a urea por la alantoicasa, codificada por el gen *aaX*, esta enzima

también puede convertir el ácido alantoico en ureidoglicolato que luego es convertido a urea mediante la enzima ureidoglicolasa. La conversión de urea en amonio y dióxido de carbono es llevada a cabo por la enzima ureasa (Scazzocchio & Darlington, 1968; Mackay & Pateman, 1982).

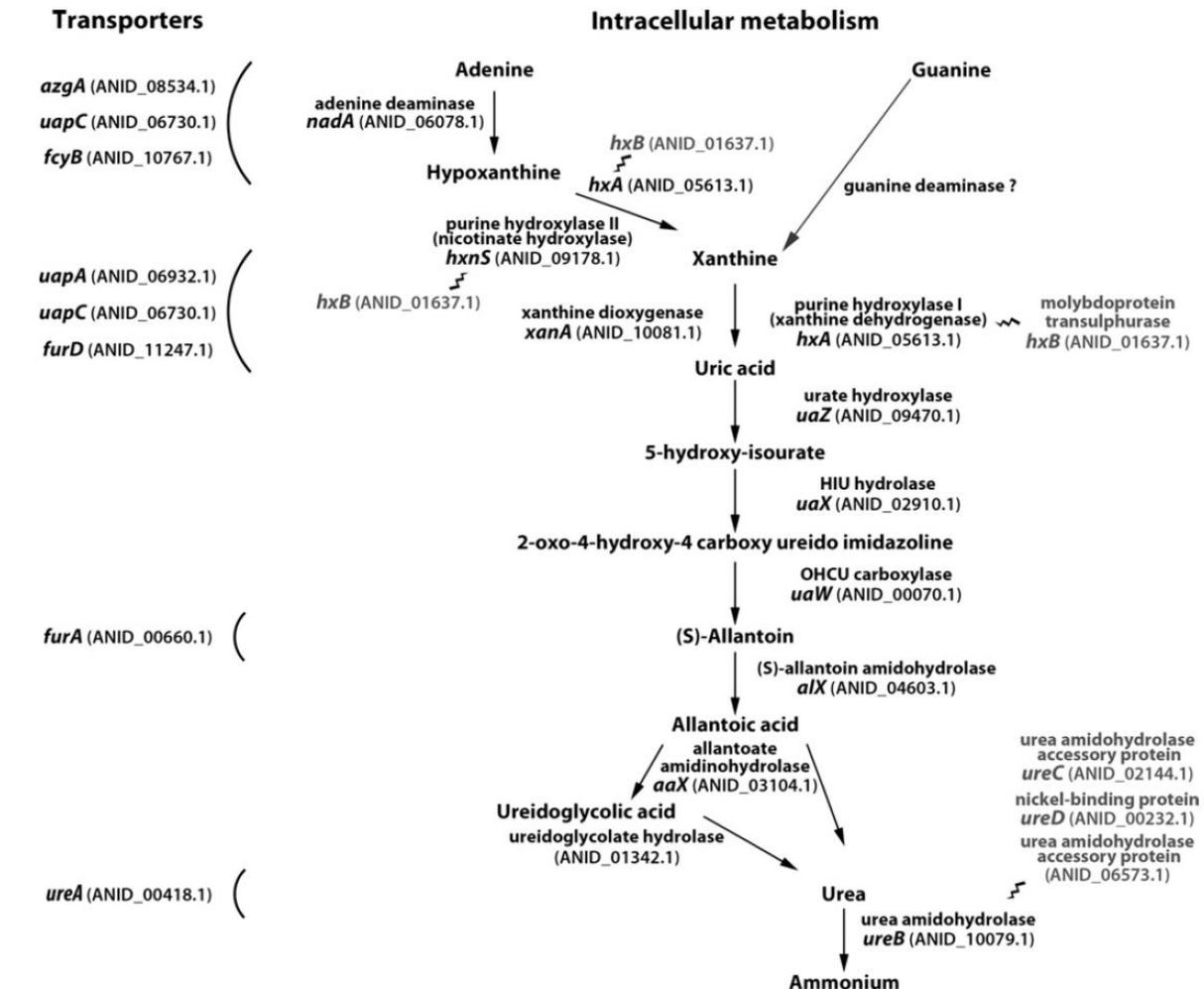


Figura 2. Vía de degradación de purinas en *A. nidulans*. A la izquierda se indican los transportadores por los cuales ingresa cada purina o derivado. A la derecha se observa en el esquema los distintos productos de la vía, indicado en cada paso la enzima responsable y el gen que la codifica. Extraído de Gournas, 2011.

1.4 Transportadores de bases nucleotídicas en hongos

Los hongos poseen por lo menos tres sistemas implicados en la captación de bases nucleotídicas. Uno para adenina-hipoxantina-citosina, uno para ácido úrico-xantina y otro para uracilo. Mediante clonado y secuenciación se ha logrado determinar que estos transportadores pertenecen a tres familias de proteínas evolutivamente distintas. Estas tres familias son: la familia de transportadores de bases nucleotídicas y ascorbato (NAT/NCS2), la familia de

simportadores catiónicos de bases nucleotídicas (NCS1), también conocida como familia de transportadores relacionados con purinas (PRT) y la familia *AzgA-like*. Todos son transportadores activos que catalizan el transporte de purinas utilizando la energía del transporte pasivo de protones (H^+) en la misma dirección (simportadores) (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

En *A. nidulans* la entrada de purinas está mediada por transportadores (Figura 2) siendo sus 3 principales: UapA, UapC y AzgA. Los dos primeros pertenecen a la familia de transportadores NAT/NCS2. UapA y UapC comparten similitudes en el perfil de sustratos que transportan, siendo idénticas en un 62% a nivel de secuencia y teniendo topologías similares (Diallinas *et al.*, 1998). UapA posee gran afinidad y capacidad de transporte para el ácido úrico y xantina, y por sus análogos, como el oxypurnol (Diallinas *et al.*, 1995; Diallinas *et al.*, 1998). UapC tiene gran afinidad por la xantina (similar a la de UapA) y moderada afinidad por el ácido úrico, además tiene la capacidad y afinidad (si bien son bajas) de transportar purinas no reconocidas por UapA (Diallinas *et al.*, 1995; De Koning & Diallinas, 2000; Kryptou & Diallinas, 2014). AzgA pertenece a la familia *AzgA-like* y posee gran afinidad y capacidad de transporte para la hipoxantina, la adenina y la guanina, y también para sus análogos, como la 8-azguanina (Cecchetto *et al.*, 2004).

1.5 Regulación transcripcional de los transportadores de purinas

El principal punto de control de la mayoría de las vías metabólicas de los hongos es a nivel de la transcripción. Así, la inducción o represión de la expresión de los genes de los transportadores de purinas en *A. nidulans*, *uapA*, *uapC* y *azgA*, se encuentra regulada por un mecanismo de represión metabólica en presencia de fuentes primarias de nitrógeno y de inducción por purinas (Scazzocchio *et al.*, 1982; Scazzocchio, 1994; Cecchetto *et al.*, 2004). En ausencia de un inductor y en presencia de una fuente de nitrógeno no represora (por ejemplo, prolina) los genes que codifican para las tres permeasas se transcriben a un nivel basal. En presencia de una fuente inductora la cantidad de ARNm de *uapA*, *uapC* y *azgA* aumenta aproximadamente unas quince, tres y siete veces respectivamente (Amillis *et al.*, 2004; Cecchetto *et al.*, 2004). La presencia de una fuente primaria ocasionará la represión de la expresión de estos genes aunque se encuentre el inductor disponible en el medio.

El ácido úrico es el inductor de la mayoría de los genes involucrados en el catabolismo de las purinas de *A. nidulans* (Scazzocchio, 1994). La inducción por ácido úrico está mediada por una proteína reguladora positiva, UaY. Es un regulador específico de la vía, activador

transcripcional que se expresa constitutivamente. Al igual que otros activadores transcripcionales, UaY pertenece a una familia que posee en su extremo amino un motivo de unión al ADN, del tipo complejo binuclear de zinc, Zn_2Cys_6 . Se ha determinado que UaY se une a los promotores de los genes que regula como dímero en sitios de secuencia 5'-CGG-6X-CCG a través de este motivo. Todos los genes controlados por UaY son además, y en forma independiente, reprimibles por amonio y glutamina (Scazzocchio *et al.*, 1982; Suárez *et al.*, 1995; Cecchetto *et al.*, 2012).

La represión por amonio o glutamina está mediada por la inactivación del factor general de transcripción, AreA (Arst & Cove, 1973; Caddick 1992), implicado en el inicio de la transcripción de más de 100 genes de las vías de utilización de fuentes de nitrógeno (Ravagnani *et al.*, 1997). AreA es una proteína que pertenece a la familia de factores GATA (Arst & Cove, 1973; Caddick *et al.*, 1986; Caddick 1992; Scazzocchio, 2000), su unión al ADN se da a través de un motivo de dedo de zinc del tipo Cys-2-Cys-17-Cys-2-Cys (Caddick *et al.*, 1986). Se ha demostrado que el sitio de unión de AreA es 5-HGATAR, (siendo H: A, T o C, y R una purina, A o G). H determina la afinidad de unión de AreA al promotor (Ravagnani *et al.*, 1997; Muro-Pastor *et al.*, 1999).

La expresión de *uapA*, *uapC* y *azgA* depende tanto de UaY como de AreA. Estudios en mutantes demuestran que la participación de ambos factores con los promotores de *uapA* y *uapC* es directa, mientras que en la regulación de *azgA*, AreA podría participar directamente en la transcripción o accionar mediante un mecanismo de exclusión del inductor, o podría presentar ambos mecanismos de regulación (Cecchetto *et al.*, 2004).

El resultado de diversos estudios sobre la expresión de transportadores en *A. nidulans* permite proponer que la expresión global de transportadores puede operar como un sistema para censar el ambiente a través de los mismos. (Amillis *et al.*, 2004).

1.6 Regulación post-traducciona l de los transportadores de purinas

Las fuentes de nitrógeno disponibles en el medio no solo participan en la regulación transcripcional de los transportadores específicos sino que las mismas también determinan su regulación post-traducciona l disparando mecanismos de ubiquitinación, endocitosis y degradación vía endosomas y vacuolas (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

Los transportadores, como la mayoría de las proteínas, son sintetizados por los ribosomas en el retículo endoplasmático, para luego ser dirigidos a su destino en vesículas compuestas a

partir de la membrana del retículo. Transportadores mal plegados usualmente son retenidos y degradados. La salida del retículo hacia su destino depende de que estén correctamente plegados, pero además dependen de factores proteicos que actúan en trans. Una vez en las vesículas son dirigidos al Golgi y luego a la membrana para cumplir su función, o a peroxisomas y vacuolas para su degradación (Fromme & Schekman, 2005; Diallinas 2007).

Frente a cambios en las condiciones del medio, como un cambio en la fuente disponible de nitrógeno, estrés o el exceso de algún sustrato los transportadores pueden ser endocitados para ser reciclados o degradados (Hicke & Dunn, 2003; Dupre *et al.*, 2004; Sorkin & von Zastrow, 2009; Foley *et al.*, 2011). La endocitosis de las permeasas depende de ciclos de ubiquitinación y desubiquitinación (Risinger & Kaiser, 2008; Lauwer *et al.* 2010).

Mediante la construcción de transportadores funcionales fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP) se ha observado la localización de los mismos dentro de la célula en las distintas etapas de desarrollo. En etapas tempranas de la germinación UapA, UapC y AzgA se localizan en la membrana plasmática, independientemente de la presencia o ausencia de purinas o de la fuente de nitrógeno disponible. Luego de la germinación en ausencia de sustrato los transportadores se siguen localizando en la membrana, si bien para UapA y AzgA se observa un poco de degradación vacuolar. En presencia de sustrato se observa un aumento de UapC y AzgA en la membrana mientras que para UapA no solo se observa un aumento en la cantidad de transportador en la membrana, sino que además se observa una notoria presencia en vacuolas. En presencia de sustrato UapA es endocitado y dirigido a vacuolas para su degradación. Estudios sugieren que la translocación del sustrato a través del propio transportador es lo que produce el aumento de la endocitosis del mismo debido a un mecanismo que censa los cambios conformacionales asociados al ciclo de transporte del sustrato. UapA es el primer ejemplo de transportador regulado por sus sustratos mediante dos mecanismos antagonistas, inducción de la transcripción en presencia de sustrato pero a su vez aumento en la endocitosis (Valdez-Taubas *et al.*, 2000; Patzopoulos *et al.*, 2007; Gournas *et al.*, 2010).

El amonio provoca un aumento en la degradación vacuolar de los transportadores (Valdez-Taubas *et al.*, 2004; Patzopoulos *et al.*, 2007; Gournas *et al.*, 2010). Cuando el amonio se encuentra en el medio no es necesaria la captación de fuentes secundarias de nitrógeno, por lo tanto no son necesarios sus transportadores y son endocitados y reciclados o degradados.

1.7 Relaciones estructura-función en UapA

UapA, transportador de xantina y ácido úrico, es uno de los transportadores eucariotas más estudiados en cuanto a la relación de su estructura con su función. Mediante la construcción de más de 100 mutantes se han establecido los residuos de importancia funcional (Diallinas & Gournas, 2008; Kosti *et al.*, 2010; Amillis *et al.*, 2011). Estos estudios han permitido identificar residuos implicados en el plegamiento y correcta ubicación en membrana y regulación postraduccional. También se han encontrado residuos implicados en la especificidad del transportador mediante mutantes que transportan sustratos que no son transportados por la proteína silvestre, como hipoxantina y adenina (Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2012).

La estructura de UapA únicamente pudo obtenerse a partir de un mutante, G441V, termoestable, expresado en *Saccharomyces cerevisiae*. Este mutante logra unir xantina pero su transporte es inactivo. La estructura del complejo del transportador unido a xantina ha sido recientemente resuelta mediante *scattering* (Alguel *et al.*, 2016).

Los resultados indican que UapA (Figura 3) contiene 14 segmentos transmembrana, organizados en un núcleo comprendiendo los segmentos 1-4 y 8-11 y un dominio de entrada formado por los segmentos 5-7 y 12-14, El *loop* extracelular entre los segmentos 3 y 4 contiene un puente disulfuro entre las Cys174 y Cys185; estos residuos son altamente conservados en hongos y son indispensables para el correcto plegamiento y localización subcelular. También se ha encontrado que el segmento 13 está estrechamente asociado a la formación del dímero, insertándose en un hueco formado en el monómero opuesto (Alguel *et al.*, 2016). La presentación de UapA en la membrana como dímero se ha evidenciado en estudios anteriores (Martzoukou *et al.* 2015).

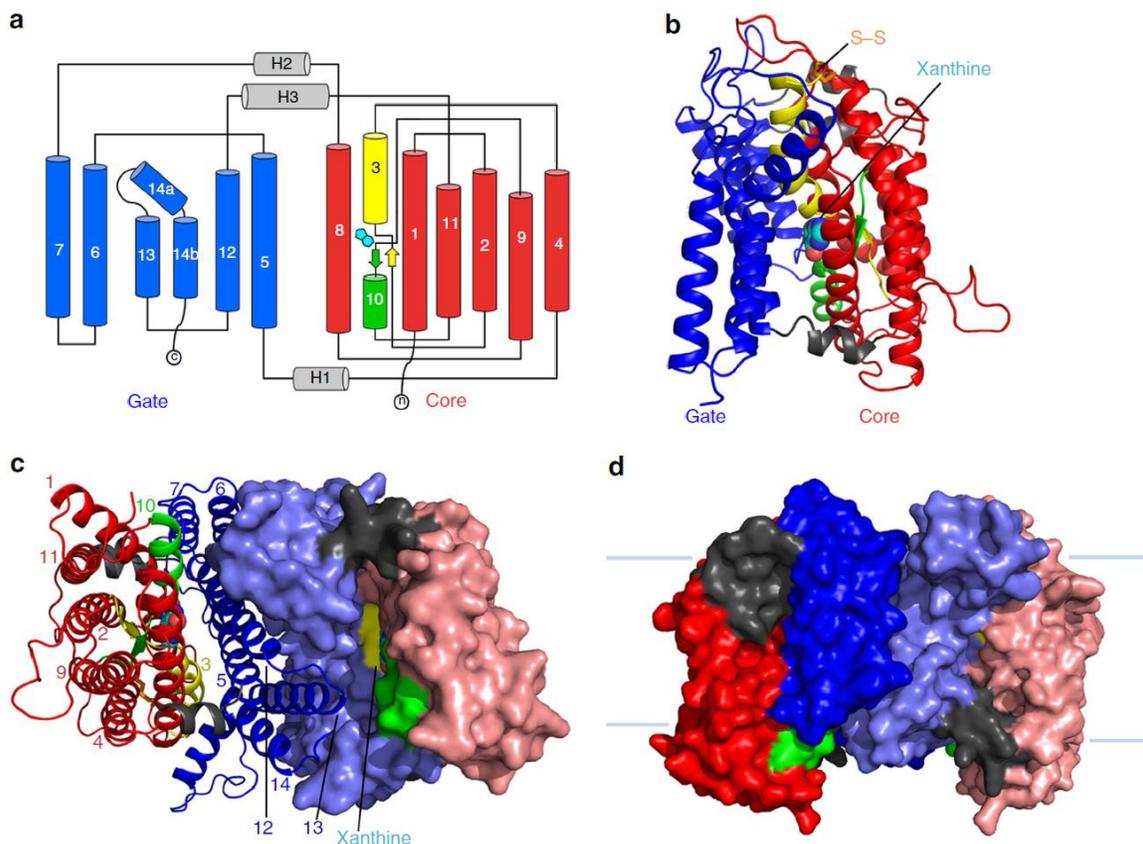


Figura 3. a) Diagrama topológico de UapA, las hélices α son representadas por los cilindros y las hélices β por las flechas. El sitio de unión al sustrato se encuentra entre la parte N terminal de los segmentos 3 y 10. La proteína se encuentra dispuesta en dos dominios, el dominio de entrada representado en azul y el núcleo representado en rojo. b) Representación del monómero de UapA con la xantina en el sitio de unión, los dominios se encuentran representados por los colores azul y rojo, correspondiendo al de entrada y núcleo respectivamente. El puente disulfuro representado corresponde al puente entre Cys174 y Cys185. c) Dímero de UapA, un monómero se encuentra representado como en b) mientras que el otro es mostrado en una representación superficial, los colores azul y rojo representan los dos principales dominios como en a) y b). d) Representación superficial del dímero de UapA, mismo código para los dominios. Las líneas celestes representan la localización respecto a la membrana. Extraído de Alguel *et al.* 2016.

El sitio de unión del sustrato se ha encontrado en las hélices de los segmentos 3 y 10 (Figura 3), algunos de los residuos implicados en el sitio de unión fueron identificados previamente por análisis mutacionales. La unión a la xantina se da mediante enlaces de hidrógeno con los residuos Gln408 (segmento 10), Glu356 (segmento 8), Ala407 (segmento 10), Val153 (segmento 3) y Phe155 (segmento 3), todos pertenecientes al núcleo de la proteína. Los residuos identificados como responsables de la especificidad de unión al sustrato son: Phe406, (sitio de unión), Val463 y Ala469 (segmento 12) y Thr526 y Phe528 (segmento 14). Estos últimos cuatro se encuentran ubicados en la interface entre el dominio de entrada y el núcleo de la proteína cerca del sitio de unión. Considerando el monómero, el rol del residuo Arg481 es difícil de interpretar, sin embargo en la formación del dímero este residuo se ubica cercano al sitio de unión, pero del monómero opuesto, parecería tener importancia en la especificidad de reconocimiento del sustrato y la translocación del mismo (Alguel *et al.*, 2016).

Estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que la dimerización de UapA es crucial para el tráfico correcto de la permeasa (Martzoukou *et al.* 2015). Recientemente se ha demostrado que la formación del dímero también es importante para la especificidad de reconocimiento del sustrato y el transporte del mismo a través de la membrana. El extremo N terminal del segmento 13 de un monómero contribuye en la translocación de una subunidad sobre la otra, lo que se conoce como mecanismo de elevador (Figura 4) (Alguel *et al.*, 2016).

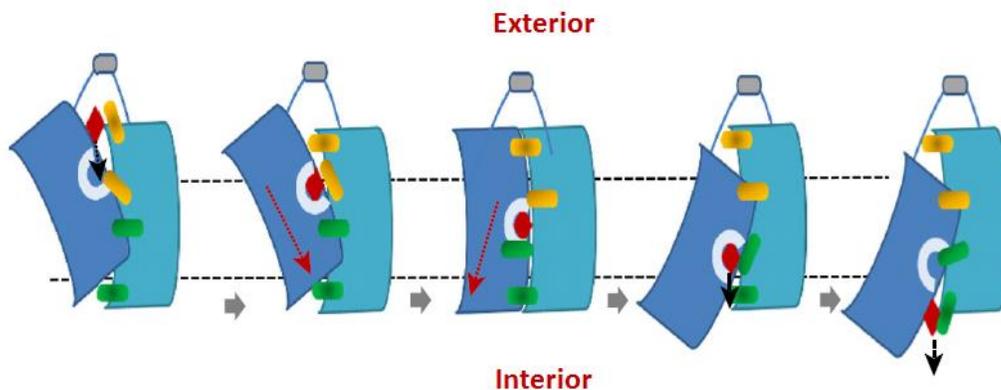


Figura 4. Transporte a través de la membrana mediante la translocación de un dominio sobre el otro, conocido como mecanismo de elevador. Extraído y modificado de Diallinas 2016.

1.8 Transportadores de purinas en *Phanerochaete chrysosporium*

Entre los Basidiomicotas degradadores de madera, *P. chrysosporium* ha sido el centro de estudio de numerosos trabajos por su capacidad de degradar sustancias recalcitrantes en medios definidos químicamente así como en sustratos complejos. Además, presenta una tasa alta de crecimiento entre los 20°C y 37°C, y produce conidias, lo que facilita las técnicas de siembra, construcción de mutantes y cruzamiento entre cepas. Es por eso que se ha convertido en el organismo modelo para los Basidiomicotas degradadores de madera, siendo el primer Basidiomicota completamente secuenciado (Martínez *et al.*, 2004; Vanden Wymelenberg *et al.*, 2005 y 2006).

P. chrysosporium posee dos transportadores específicos de purinas funcionales, PhU y PhZ, capaces de transportar ácido úrico e hipoxantina respectivamente. Este organismo tiene la capacidad de utilizar purinas como fuente de nitrógeno (Barraco-Vega *et al.* 2017). Se demostró la funcionalidad de estos transportadores mediante el clonado de los genes y su expresión en una cepa de *A. nidulans* deficiente de transportadores de purinas (*uapA⁻ uapC⁻ azgA⁻*), por lo tanto incapaz de crecer con purinas como única fuente de nitrógeno. Los genes fueron clonados bajo un promotor y un terminador de *A. nidulans*. Se observó que expresando

estos transportadores de *P. chrysosporium* la cepa deficiente de transportadores propios puede crecer utilizando ácido úrico o hipoxantina como fuente de nitrógeno, probando la funcionalidad de PhU y PhZ.

En *P. chrysosporium* la expresión de *phU* es inducida por purinas (adenina, hipoxantina, xantina y ácido úrico) y en condiciones de carencia de fuentes primarias de nitrógeno, a su vez es reprimida por amonio, urea y algunos aminoácidos. La expresión de *phZ* es inducida por hipoxantina y adenina, ligeramente inducida por xantina y reprimida por urea y aminoácidos. Este gen es expresado a niveles basales en presencia de ácido úrico, amonio o prolina, o cuando el micelio carece de nitrógeno.

Tanto PhU como PhZ son regulados a nivel post-traducciona l dependiente de las condiciones del medio. Se encuentran localizados en la membrana plasmática bajo condiciones de crecimiento con el sustrato adecuado, observándose también su presencia en vacuolas. Frente a condiciones de represión la cantidad de proteína en las vacuolas aumenta considerablemente y prácticamente no se encuentra transportador asociado a la membrana. Este fenómeno de endocitosis de las permeasas frente a una fuente primaria de nitrógeno se ha observado para otros transportadores en *A. nidulans* estudiados hasta el momento (Barraco-Vega *et al.* 2017).

1.9 Similitudes y diferencias entre UapA (*A. nidulans*) y PhU (*P. chrysosporium*)

El gen *phU* presenta alta homología con el gen *uapA* de *A. nidulans*, siendo la proteína PhU un 50% idéntica a UapA y con una similitud de 69% (Barraco-Vega *et al.* 2017). La expresión transcripcional de ambos genes se induce en presencia de purinas como única fuente de nitrógeno. La presencia de una fuente primaria de nitrógeno como el amonio o glutamina reprimen la expresión de ambos genes aunque en el medio haya disponibilidad de purinas. Expresados en el mismo contexto genómico y metabólico, en presencia de sustrato ambos transportadores se localizan en la membrana y presentan la misma regulación post-traducciona l, responden al mecanismo de endocitosis en respuesta a una fuente primaria de nitrógeno.

Ambas permeasas transportan xantina y ácido úrico, sin embargo, existen diferencias entre PhU y UapA en los procesos de reconocimiento y/o transporte de los mismos. Esto se demostró por el método de competencia de un análogo tóxico con el compuesto de estudio (Barraco-Vega *et al.*, 2017) (Figura 5). Si ambos sustratos son transportados por la permeasa el compuesto de estudio desplazará al tóxico permitiendo el crecimiento. La concentración

mínima del compuesto capaz de desplazar al tóxico (MCD), y por tanto permitir el crecimiento, se utiliza como medida para comparar la capacidad de transporte de una proteína frente a distintos sustratos. El oxypurinol es el análogo tóxico utilizado en estos experimentos por ser transportado por ambas permeasas. La protección al oxypurinol por parte de la xantina y el ácido úrico para PhU confirma el transporte de los mismos a través de la permeasa. Como se observa en la figura 5, 7 μ M de xantina es suficiente para la protección total, mientras que 70 μ M de ácido úrico logran una protección parcial.

PhU parece transportar también uracilo y uridina en competencia con oxypurinol, presentando ambos un MCD de 35 μ M. No se observa crecimiento en experimentos de competencia con adenina, hipoxantina, guanina, 6-tioguanina, 8-azguanina, 2,8-ditio-6-oxipurina, 2-aminopurina o ácido 6-diroxynicotínico incluso en concentraciones mayores a 140 μ M. UapA presenta un perfil similar, transporta los mismos sustratos, sin embargo el perfil de transporte de los mismos aparece distinto para el ácido úrico, donde UapA presenta un fenotipo de crecimiento normal a menores concentraciones de sustrato que PhU, lo cual sugiere diferencias entre ambos transportadores en los procesos de reconocimiento y/o transporte de ácido úrico (Barraco-Vega *et al.*, 2017).

A pesar de las diferencias en el transporte son muchas las similitudes. La estructura tridimensional de PhU fue modelada *in silico*, antes de que el cristal de UapA fuera publicado (ver sección 1.7; Alguel *et al.*, 2016), por homología en base a la estructura cristalográfica de la proteína UraA (familia NAT, transportador de uracilo) de *E. coli*. (Barraco-Vega, Leone & Cecchetto, resultados no publicados). A partir del mismo se observa una gran similitud entre PhU y UapA a nivel de estructura terciaria (Barraco-Vega *et al.*, 2017), así como a nivel de estructura primaria (como se menciona al comienzo de esta sección, 50% identidad, 69% similitud). Para UapA se han identificado 23 residuos determinantes del correcto plegamiento del transportador, su tránsito subcelular y capacidad de transporte. De estos 23 residuos solo 5 no se conservan en PhU: A120/113Q, V157/151M, S457/441A, R486/469A y P546/527G (notación PhU/UapA).

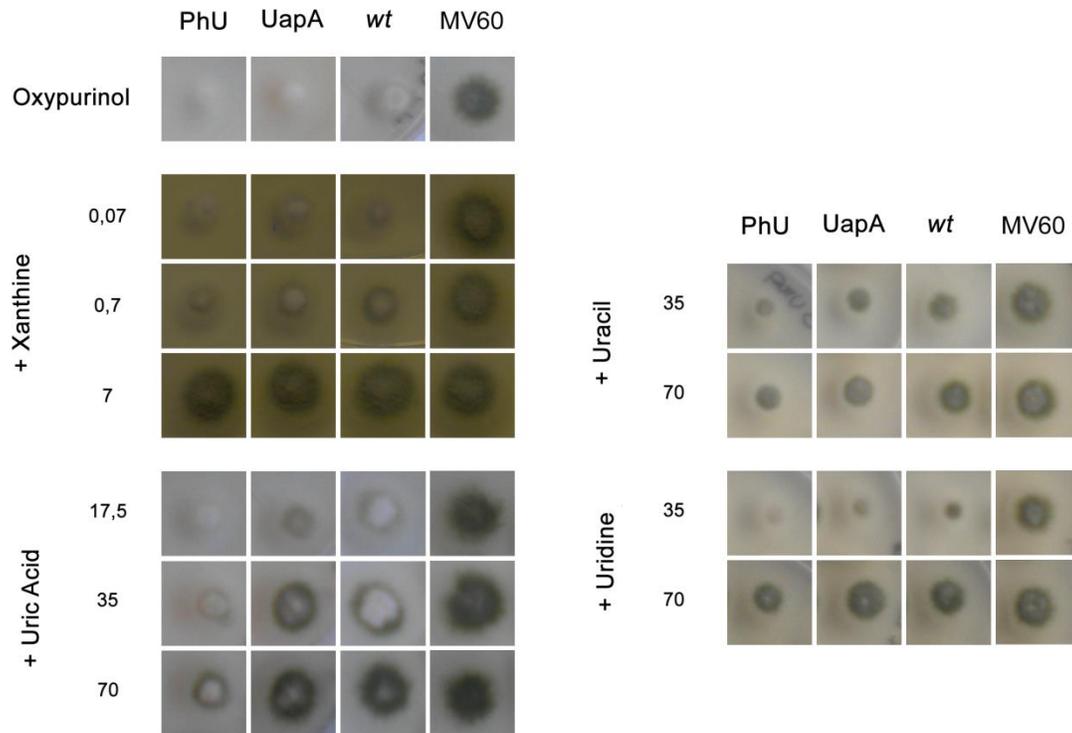


Figura 5. Resultados de la prueba de competencia entre distintos sustratos (xantina, ácido úrico, uracilo y uridina) y oxypurinol (análogo tóxico) para PhU y UapA en *A. nidulans*. *A. nidulans::phU*. Wild-type (PhU), una cepa *uapA*⁺ (UapA), *A. nidulans* (wt) y una cepa de *A. nidulans* deletada de los principales transportadores (*azgA*⁻, *uapA*⁻, *uapC*⁻) (MV60) fueron usadas como controles. El medio fue suplementado con oxypurinol (0.1 mM) y diferentes concentraciones (como se observa en la figura) de xantina, ácido úrico, uracilo o uridina (μM). Nitrato de sodio (10 mM) como fuente de nitrógeno. Extraído de Barraco-Vega *et al.*, 2017.

Tres de estos residuos se encuentran en una posición topológicamente análoga, A120/113Q en el loop STM 1-2, R486/469A en STM12 y P546/527G en STM 14. Los otros dos residuos tienen una ubicación en PhU distinta respecto de UapA, M151 se encuentra en el STM3 mientras que V157 se encuentra en el motivo beta antiparalelo, y A441 se encuentra en el *loop* STM11-12 mientras que S457 se encuentra en la hélice interna entre STM11 y STM12 (Barraco-Vega, resultados no publicados). En base a estos datos se plantea la hipótesis de que estos 5 residuos podrían estar implicados en la conformación de la estructura y función de la proteína, y explicarían las diferencias observada a nivel del transporte de sustratos.

2. Objetivo y estrategias

2.1 Objetivo

Determinar el rol de residuos clave (A120/113Q, V157/151M, S457/441A, R486/469A, P546/527G) que podrían estar implicados en la conformación de la estructura y función del transportador PhU mediante la construcción y análisis de mutantes.

2.2 Estrategia

La estrategia consiste en la construcción de mutantes puntuales PhU, sustituyendo aminoácidos en la proteína silvestre por el aminoácido presente en la posición topológicamente equivalente de UapA.

Las proteínas mutantes se expresarán en igual contexto genético, es decir, en una cepa de *A. nidulans* carente de los principales transportadores de purinas (AN11_MV060: *uapA⁻ uapC⁻ azgA⁻*). El efecto de cada mutación se evaluará por crecimiento en presencia de purinas y análogos y seguimiento *in vivo* de la localización subcelular del transportador mediante microscopía de fluorescencia. (Figura 6).

Construcción de cepas

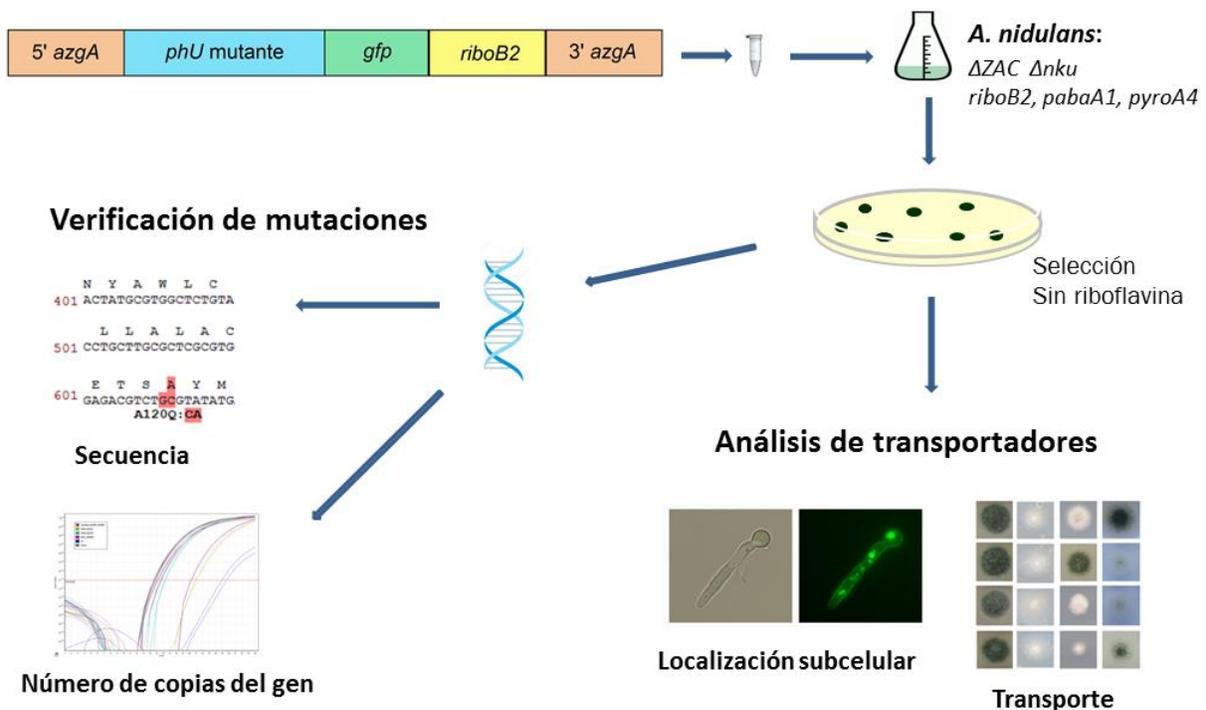


Figura 6. Estrategia planteada para la construcción y análisis de mutantes de la proteína PhU.

2.2.1 Construcción de cepas portadoras de transportadores mutantes

Construcción del *cassette* de transformación. Mutagénesis sitio dirigida.

Los cambios en la secuencia se introducirán por mutagénesis sitio dirigida durante la construcción de lo que llamaremos *cassette*. Cada *cassette* tendrá un extremo 5' UTR del gen *azgA* de *A. nidulans* seguido del gen *phU* con la mutación que corresponda, el gen de la GFP (para el posterior estudio de localización subcelular) y el gen de selección, *riboB*⁺, que completa la vía de síntesis de la riboflavina, y por último el extremo 3'UTR del *azgA* de *A. nidulans* (Figura 7).

La construcción del *cassette* consiste en la obtención de dos fragmentos que se solapan en la región de la mutación lo que permite su posterior unión mediante PCR de fusión (Szewczyk et al., 2006) (Figura 7). Uno de los fragmentos (lo llamaremos 5') comprende el 5'UTR del gen *azgA* de *A. nidulans* seguido de parte del gen *phU* de *P. chrysosporium* hasta la mutación que se quiere insertar. El segundo fragmento (lo llamaremos 3') va desde el 3'UTR del gen *azgA* unido al gen para la riboflavina, *riboB*⁺, unido al gen para la GFP (*gfp*), seguido del gen *phU* desde 3' hacia 5' hasta la mutación deseada.

Los fragmentos se obtienen a partir del ADN de la cepa AN20_tphU28 (ver sección 5.3) como molde, una cepa resultante de la transformación de la cepa triple deletada con un *cassette* idéntico al que se busca construir pero con el ADN copia (secuencia sin intrones) del gen *phU* silvestre. Los *primers* para estas PCR fueron diseñados complementarios a la región a mutagenizar, quedando la mutación centrada y teniendo entre 25-30 nucleótidos (pb). Entre sí deben solaparse si bien pueden estar levemente desfasados. Ambos fragmentos portadores de la mutación en cuestión son finalmente fusionados por PCR donde los fragmentos actúan como moldes y los *primers* se ubican en los extremos 5'Z y 3'Z siendo unas bases más internos a los de la primera amplificación.

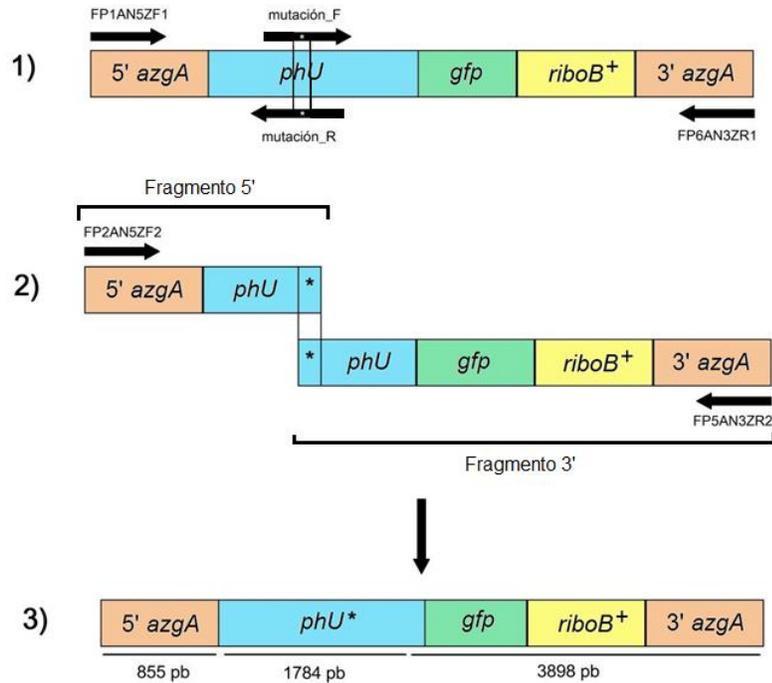


Figura 7. Esquema del método de mutagénesis sitio dirigida para la obtención de los *cassettes* con *phU* mutado. 1) Mutagénesis sitio dirigida, la mutación a introducir se encuentra en los *primers* internos. 2) Unión de los fragmentos obtenidos mediante PCR para fusión, las regiones con la mutación (*) se solapan actuando como *primers*. 3) Resultado, *cassette* de *phU* con la mutación y fusionado al gen de la GFP y al gen *riboB*⁺, con 5' y 3' UTR de *azgA* en sus extremos.

Transformación de *A. nidulans* y selección.

Con los *cassettes* antes construidos se transforma *A. nidulans* (AN11_MV060: *uapA*⁻, *uapC*⁻, *azgA*⁻). Esta cepa además es auxótrofa para riboflavina, ácido p-aminobenzoico y piridoxina debido a las mutaciones *riboB2*, *pabaA1* y *pyroA4* respectivamente. Los transformantes que incorporen el *cassette* se podrán seleccionar en medio carente de riboflavina (complementación de la auxotrofia por el gen de selección incluido en el *cassette* de transformación, *riboB*⁺) y con amonio como fuente de nitrógeno.

El *cassette* se une al cromosoma de *A. nidulans* por recombinación homóloga a través de los extremos 5'*azgA* y 3'*azgA*. Esta cepa tiene a su vez deletado el gen *nkuA* que codifica la subunidad 1 de la helicasa II, implicada en procesos de recombinación heteróloga. Eliminado este gen se disminuye la integración de las secuencias foráneas en otros lugares del genoma y por tanto favorece la recombinación homóloga. De esta forma las proteínas estarán bajo el mismo promotor ya que se ubicarán en el mismo *locus*.

Una vez purificados los transformantes *ribo*⁺, se verificará la presencia de la mutación por extracción de ADN, amplificación del gen *phU* y análisis de secuencia y determinación del número de copias del *cassette* presente en cada cepa por qPCR.

Selección de transformantes monocopia. Cuantificación mediante PCR en tiempo real.

Se utiliza la técnica de PCR en tiempo real para la determinación del número de copias del gen *phU* presente en cada una de las cepas obtenidas y selección de cepas monocopia.

La diferencia de la técnica de PCR en tiempo real con respecto a la PCR convencional es que la amplificación es monitoreada en tiempo real mediante el uso de métodos fluorescentes, combinando la amplificación en simultáneo con la detección. La intensidad de la fluorescencia se correlaciona con la concentración de los productos amplificados (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996). Los datos se obtienen en forma de curvas de amplificación, mediante las cuales se puede cuantificar la cantidad inicial de moléculas de molde con alta exactitud y dentro de un amplio rango de concentraciones.

Las señales son generadas por moléculas fluorescentes con especificidad por el ADN doble cadena o por sondas fluorescentes específicas (Wittwer *et al.*, 1997; Wilhelm & Pingoud, 2003). La molécula para el ADN doble cadena utilizada más frecuentemente es el SYBR Green I, que se une al surco menor de la doble hebra de ADN, independientemente de la secuencia. Si bien esta molécula no es específica para una secuencia en particular se puede utilizar cuando es uno solo el producto de amplificación a detectar y tiene la ventaja que permite el análisis de las curvas de *melting*, para caracterizar las secuencias amplificadas en base a sus temperaturas de fusión (T_m), parámetro que depende de la longitud del fragmento y de las bases que lo componen (Ririe *et al.*, 1997; Wilhelm & Pingoud, 2003; Zipper *et al.*, 2004).

El análisis cuantitativo está basado en curvas de cuantificación. Cada curva presenta 3 fases distintas: una fase inicial, en que no se detecta acumulación de producto; una fase exponencial, donde hay correlación entre el número de moléculas sintetizadas y el tiempo transcurrido; y una fase de meseta, donde ya no hay amplificación. Extrapolando los datos de la fase exponencial es posible calcular el número de copias del molde al comienzo de la reacción. El número de copias del molde también puede ser estimado con gran precisión a partir del número de ciclos necesarios para que la señal pase de la fase inicial a la exponencial, lo que se conoce como umbral. El umbral debe interceptar la curva en la fase exponencial, el punto de intersección corresponde a un número de ciclo y es llamado *threshold* (umbral) *value* (Ct) (Wilhelm & Pingoud, 2003).

De los dos métodos de cuantificación, absoluto y relativo, en este trabajo se determinará el número de copias por cuantificación relativa. Este método relaciona la señal del gen de interés

en una muestra del grupo "tratado" con una del grupo "no tratado" (muestra o condición calibradora). En nuestro caso la muestra calibradora será la cepa AN20_tphU28 portadora de una única copia de *phU* silvestre. Por otra parte, la señal del gen de interés se normaliza para cada muestra con respecto a un gen de referencia (Marten *et al.*, 1994). El gen de referencia debe ser un gen constitutivo, elegimos el gen de la β -actina (*acn*).

Existen varios modelos matemáticos que permiten el cálculo del cociente de expresión relativa basados en la diferencia entre los Ct. Los métodos más conocidos son: el método de la curva estándar, el "delta-delta Ct" (Livak & Schmittgen, 2001) y el modelo de Pfaffl (Pfaffl, 2001), entre otros. En este caso utilizamos el método "delta-delta Ct" que calcula los cambios en la expresión génica como la diferencia relativa entre una muestra experimental y un calibrador (Ecuación 1), para ello asumimos eficiencias de amplificación óptimas tanto para el gen de interés como para el gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001).

$$R = \frac{(Ct_{calibrador} - Ct_{tratado})_{gen\ de\ interés}}{(Ct_{calibrador} - Ct_{tratado})_{gen\ de\ referencia}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

2.2.2 Análisis de transportadores mutados

Test de crecimiento

El transporte a través de las proteínas PhU (mutantes y silvestre) puede evaluarse cualitativamente por crecimiento gracias a que tienen fenotipos de crecimiento visibles en medio sólido. Cuando una purina es la única fuente de nitrógeno presente en el medio, la capacidad del transportador específico determinará el crecimiento pudiendo haber diferentes fenotipos: crecimiento nulo, intermedio o similar al silvestre. Mutaciones que afecten la capacidad de transporte también pueden generar fenotipos intermedios.

Se utilizan además análogos tóxicos de purinas. Si la permeasa transporta el tóxico el ingreso del mismo afectará el crecimiento. Es decir, si la cepa posee un transportador que permita transportar la purina, se observará un fenotipo de crecimiento normal, sin embargo si transporta un análogo tóxico este interferirá en el crecimiento. Para el caso contrario, si el hongo no posee ningún transportador con la capacidad de ingresar el análogo crecerá sin problema en presencia del mismo (Darlington & Scazzocchio, 1976).

Localización subcelular por microscopía de fluorescencia

Desde 1999 el marcado con la proteína verde fluorescente (GFP) se ha convertido en una herramienta muy utilizada para el seguimiento *in vivo* de la expresión subcelular, localización en membranas y recambio (*turnover*) desde las mismas, tanto de fenotipos silvestres como de mutantes. La GFP se fusiona al extremo C terminal del transportador ya que la región N terminal es crítica para la apropiada translocación (Diallinas, 2016). Todos los transportadores de la familia NAT analizados hasta el momento conservan su cinética y especificidad cuando son marcados con GFP (Valdez-Taubas *et al.*, 2000; Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou *et al.*, 2007; Diallinas, 2016; Barraco-Vega *et al.* 2017).

3. Resultados y discusión

3.1 Construcción de *cassettes*

3.1.1 Construcción de *cassettes* por mutagénesis sito dirigida

Las mutaciones A120Q, V157M, S457A, R486A, P546G se generaron por mutagénesis sitio dirigida (Sección 2.2.1 Figura 7). Los *primers* que introducen la mutación deseada (Tabla 1), es decir el *primer* reverso (R) en amplificación del fragmento 5' y el *primer* forward (F) en amplificación del fragmento 3', son totalmente solapantes entre sí.

Tabla 1. Mutaciones introducidas en secuencia de *primers* para sustitución de aminoácidos del transportador PHU. Las minúsculas indican las mutaciones introducidas. La secuencia completa se describe en Sección 6.2 Tabla 4.

Mutación	Primer	Codón silvestre	Mutación	%GC	Longitud (pb)
A120Q	A120Q_F	GCG	caG	53	36
	A120Q_R	CGC	Ctg	53	36
V157M	V157M_F	GTG	aTG	60	30
	V157M_R	CAC	CAt	60	30
S457A	S457A_F	TCG	gCc	61	31
	S457A_R	CGA	gGc	61	31
R486A	R486A_F	CGC	gcC	57	35
	R486A_R	GCG	Ggc	57	35
P546G	P546G_F	CCC	ggC	50	32
	P546G_R	GGG	Gcc	50	32

La mutación A120Q se introdujo en los fragmentos 5' y 3' por amplificación con los *primers* FP2AN5ZF1 - A120Q_R y A120Q_F - FR6AN3ZR1 (Sección 6.2 Tabla 4) respectivamente. Se ensayaron diferentes temperaturas de hibridación (57°C, 60°C y 65°C para el fragmento 5', y 58°C y 60°C para el fragmento 3'). A 60°C se obtuvo una banda de ≈1200 pb correspondiente al tamaño esperado para el fragmento del extremo 5' (Figura 8 a). El amplicón de ≈5400 pb correspondiente al tamaño esperado del fragmento 3' se obtuvo a 58°C (Figura 8 b). Ambos fragmentos fueron fusionados por PCR de fusión con los *primers* FP2AN5ZF2 y FP5AN3ZR2 (Sección 6.2 Tabla 4) dando un producto de ≈6600 pb (Figura 8 c).

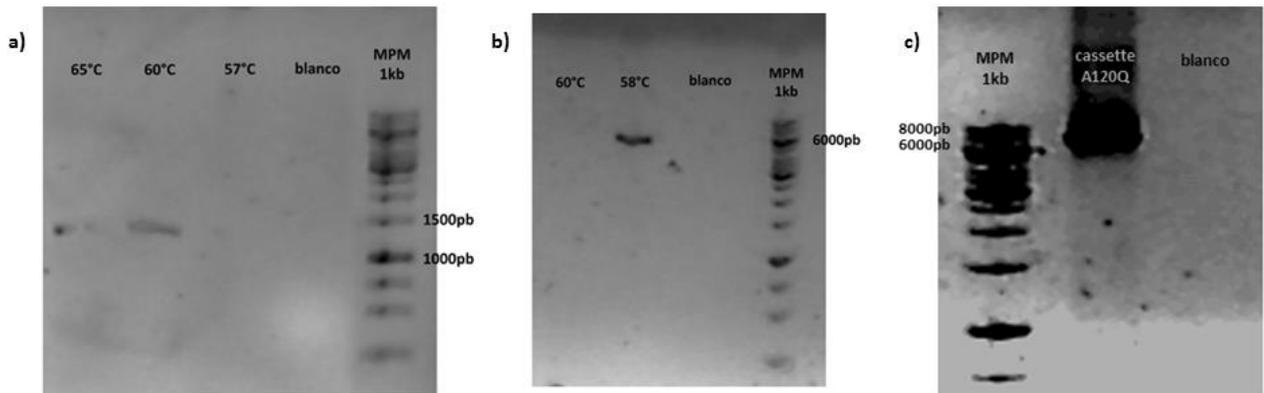


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa, productos de amplificación para la mutación A120Q a distintas temperaturas de *annealing*. a) extremo 5' de ≈1200 a 60°C. b) extremo 3' de ≈5400 pb a 58°C. c) Fusión del *cassette*, producto de ≈6600 pb.

De igual forma, utilizando los *primers* FP2AN5ZF1 - P546G_R y P546G_F - FR6AN3ZR1 (Sección 6.2 Tabla 4) y temperatura de *annealing* de 58°C se obtuvieron los fragmentos 5', tamaño ≈2440 pb (Figura 9 a) y 3', tamaño ≈4100 pb (Figura 9 b) con la mutación P546G. Ambos fragmentos fueron fusionados por PCR de fusión con los *primers* FP2AN5ZF2 y FP5AN3ZR2 (Sección 6.2 Tabla 4) dando un producto de ≈6600 pb (Figura 9 c).

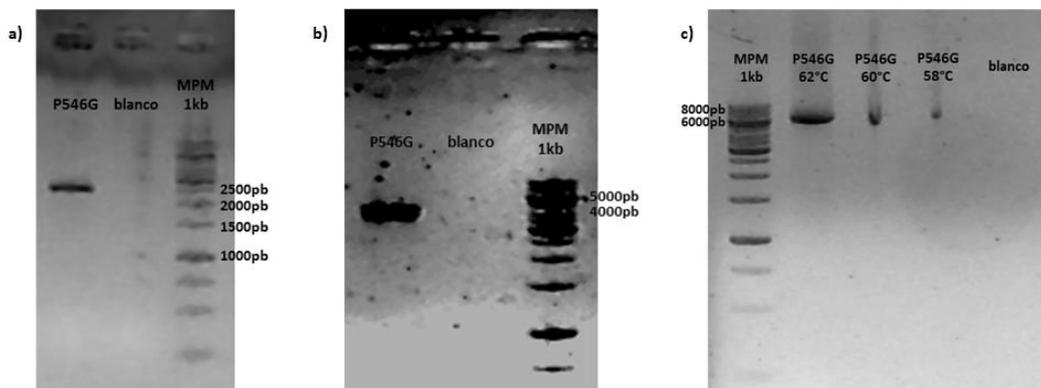


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación para mutación P546G a) extremo 5' de ≈2400 pb. b) extremo 3' de ≈4100 pb. c) Fusión del *cassette* a diferentes temperaturas de *annealing*, producto de ≈6600 pb.

Los *cassettes* obtenidos (A120Q y P546G) fueron purificados para ser usados en la transformación de *A. nidulans* (Figura 10).

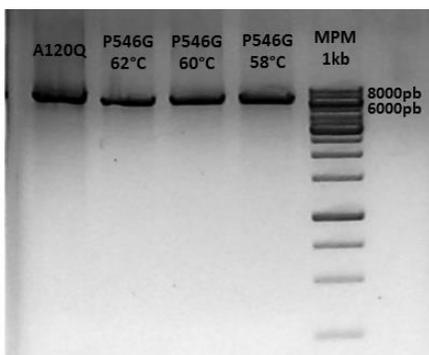


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los *cassettes* A120Q y P546G purificados.

Para las mutaciones V157M, S457A y R486A solo se obtuvo uno de los fragmentos: el fragmento 5' para V157M (≈ 1300 pb) y R486A (≈ 2300 pb) (Figura 11), y el fragmento 3' para S457A (≈ 4400 pb) (Figura 12).

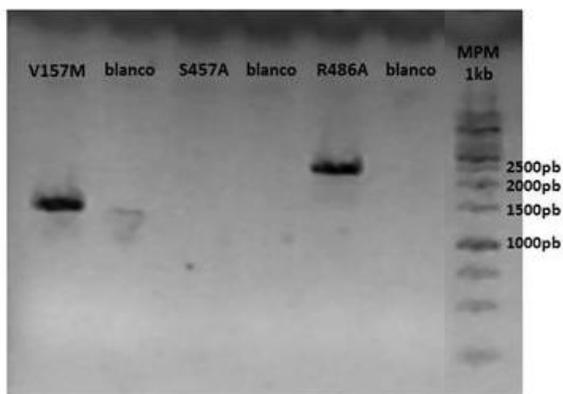


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación para las mutaciones M151V, A441S y A469R, temperatura de *annealing* 58°C. Fragmentos 5' de ≈ 1300 pb y ≈ 2300 pb para M151V y A469R respectivamente.

Se ensayaron varias condiciones de amplificación, tiempo de elongación, gradiente de temperatura de *annealing* (58°C, 60°C y 65°C) y diferentes concentraciones de DMSO (3%, 6%, 10%) para evitar la formación de dímeros o estructuras secundarias. Entre todas las condiciones ensayadas solo se obtuvo amplificación del fragmento 3' de S457A a 58°C y 60°C de temperatura de *annealing* (Figura 12).



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación a distintas temperatura de *annealing* para la obtención del extremo 3' de V157M, S457A y R486A. Se obtiene un fragmento de ≈ 4300 pb a 58°C y 60°C para S457A.

Tabla 2. Características de los primers utilizados en el método de mutagénesis sitio dirigida. El sombreado indica aquellos *primers* con los cuales no se obtuvo amplificación. Los *primers* FP1AN5ZF1 y FP6AN3ZR1 fueron utilizados para la amplificación de todos los fragmentos 5' y 3' respectivamente (Ver Figura 7).

Mutación	Primer	Tm (°C)	%GC	Longitud (pb)	Propiedades del primer desde mutación-extremo 3'		
					Tm (°C)	%GC	Distancia mutación-extremo 3' (pb)
A120Q	A120Q_F	79,1	53	36	47,6	47,1	17
	A120Q_R	79,1	53	36	58,9	58,8	17
V157M	V157M_F	80,5	60	30	60,5	62,5	16
	V157M_R	80,5	60	30	42,6	61,5	13
S457A	S457A_F	81,3	61	31	29,6	58,3	12
	S457A_R	81,3	61	31	54,3	56,2	16
R486A	R486A_F	84,3	57	35	51,5	56,2	16
	R486A_R	84,3	57	35	61,2	52,9	17
P546G	P546G_F	74,2	50	32	45,2	57,1	14
	P546G_R	74,2	50	32	40,9	37,5	16
-	FP1AN5ZF1	58,6	24	33	-	-	nc
-	FP6AN3ZR1	60,1	20	55	-	-	nc

Frente a estos resultados se volvió a analizar las características termodinámicas de los *primers*, mediante el programa Vector NTI (Invitrogen) y Primer3Plus (Bioinformatics). Los resultados obtenidos, ΔG de formación de dímeros y horquillas, no explican por qué en algunos casos hay amplificación y en otros no. Cuando se compara la composición de bases (Tabla 1) se observa que los *primers* A120Q y P546G (*cassettes* completos) tienen contenido G+C en el entorno de 50% mientras que en otros *primers* es más alto, entre 57 y 61%. Esto sugiere que el contenido G+C de los *primers* A120Q y P546G sería más adecuado, pero no explica porque V157M_R, S457A_F y R486A_R no amplifican, ya que para cada caso el *primer* complementario (mismo contenido G+C) amplificó.

También se analizó la distancia entre el extremo 3' del *primer* y el lugar donde se encuentra la mutación, pudiendo llegar a ser relevante para V157M_R y S457A_F, suponiendo que la cercanía de la mutación al extremo afectara, pero tampoco se puede concluir que sea eso ya que el *primer* R486A_R tampoco amplificó y su distancia es similar al resto de los *primers* que si amplificaron.

Otras variables como la calidad del ADN molde, los dNTPs y la enzima utilizada quedan descartados como posibles causas ya que se utilizaron los mismos en todas las reacciones de PCR.

La única deducción posible es que hubiese algo en el extremo 3' de estos *primers* que impida la correcta unión al molde, o que la unión se deshaga con facilidad pero no es atribuible a ninguna de las características analizadas.

3.1.2 Construcción del *cassette* de *uapA*

Para evaluar el efecto de cada mutación introducida en la permeasa PhU, se requieren cepas de referencia con las cuales comparar fenotipos (crecimiento, transporte) y localización subcelular: *A. nidulans* que exprese PhU silvestre (AN20_tph28, Barraco-Vega et al., 2017)) y otra portadora de UapA silvestre, introducidos en el mismo contexto genético que los mutantes de *phU*.

Para obtener esta segunda cepa se construyó un *cassette* similar a los de *phU* pero con el gen de *uapA*⁺. En este caso la estrategia consiste en la amplificación de 3 partes (5'*azgA*, *uapA* y *gfp::riboB*⁺::3'*azgA*) por separado y luego se unen mediante el método de PCR de fusión debido al solapamiento entre las éstas (Figura 13).

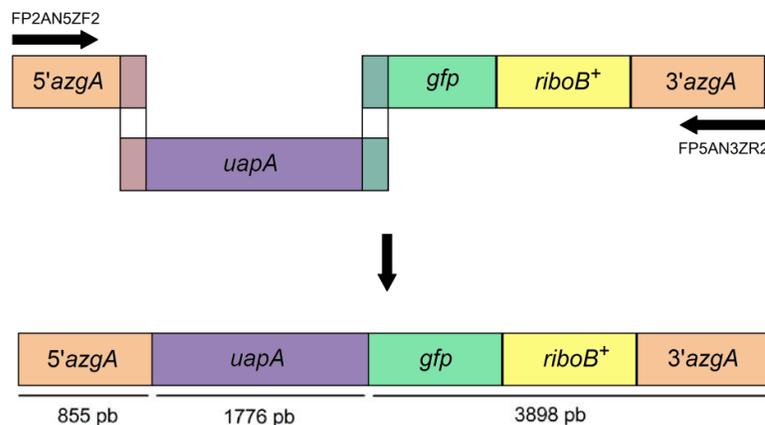


Figura 13. Esquema para la obtención del *cassette* de *uapA*

Se realizan las PCR para la obtención de las distintas partes del *cassette* (Ver Sección). A temperatura de *annealing* de 58°C se obtienen los productos de ≈900pb, ≈1800pb y ≈3900pb correspondientes a los fragmentos 5' *azgA*, *uapA* y *gfp::ribo⁺::3'Z* respectivamente (Figura 14 a). Estos tres fragmentos son fusionados en una reacción de PCR con los primers FP2AN5ZF2 y FP5AN3ZR2 (Sección 6.2 Tabla 4) obteniéndose un producto de ≈6600pb, correspondiente al tamaño esperado para el *cassette uapA* completo (Figura 14 b).

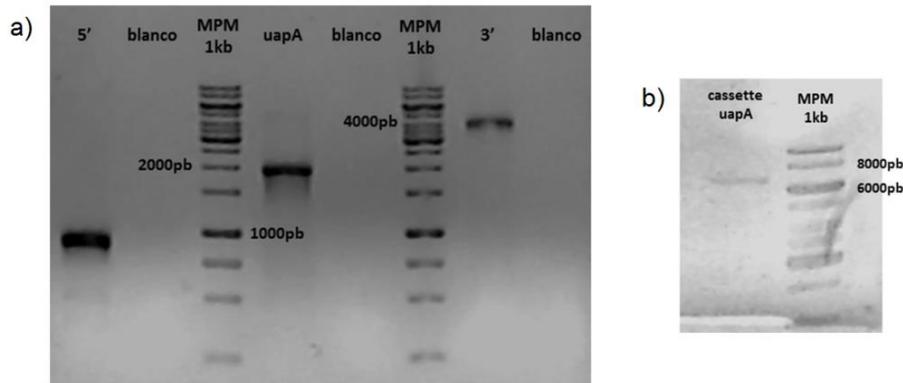


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a) obtención de las distintas partes para la construcción del *cassette uapA*; b) fusión del *cassette uapA*.

3.2 Transformación de la cepa *A. nidulans* (*uapA⁻ uapC⁻ azgA⁻*) con los *cassettes* obtenidos

Con los *cassettes* obtenidos (A120Q, P546 y UapA) se transformó una cepa de *A. nidulans* carente de los principales transportadores, *uapA⁻ uapC⁻ azgA⁻* (AN11_MV060) mediante el protocolo de transformación descrito en la sección 6.7. La cepa AN11_MV060 tiene auxotrofia por la riboflavina debido a una mutación de pérdida de función en el gen *riboB* (*riboB2*). Luego de la transformación se plaquearon los protoplastos en un medio sin riboflavina, lo cual permite la selección de los transformantes que incorporaron el *cassette* (portador de *riboB⁺*).

De la transformación de la cepa *A. nidulans* con los *cassettes* A120Q y P546G se obtuvieron, 7 transformantes para la primera mutación y 3 transformantes para la segunda. Se realizaron varias transformaciones con el *cassette* UapA, en ningún caso se obtuvieron transformantes. Sin embargo, el control de regeneración de protoplastos creció correctamente, esto quiere decir que la falla en la transformación no se debe al estado de los protoplastos. Suponemos que podría deberse a la baja concentración del ADN utilizado en la transformación (Figura 14 b). La construcción del *cassette* UapA no fue sencilla, obteniéndose en varias ocasiones un producto

de $\approx 4500\text{pb}$ en vez del *cassette* de $\approx 7000\text{pb}$, o encontrándose ambos productos y un tercero de $\approx 1000\text{pb}$ (Figura 15). A pesar de variar la temperatura de *annealing* esto no determinaba cuando se obtendría cuál de los productos. Finalmente se obtuvo una única banda con el tamaño deseado con la que se transformó a pesar de la baja cantidad. Por lo tanto, se decidió continuar con el análisis de los mutantes *phU* obtenidos usando como control únicamente la cepa con PhU silvestre.

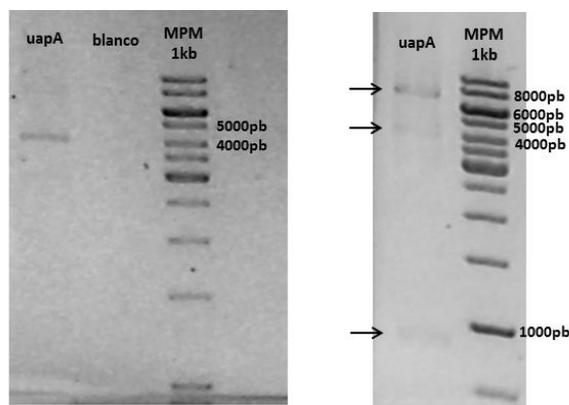


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la obtención del *cassette* de *uapA* donde a) no se obtiene el producto esperado o b) si se obtiene se encuentran contaminaciones de productos resultantes de uniones no específicas de los *primers*.

3.3 Análisis de los transformantes

3.3.1 Selección de los transformantes

La cepa utilizada para la transformación (*uapA*⁻, *uapC*⁻, *azgA*⁻) es además auxótrofa para riboflavina, ácido p-aminobenzoico y piridoxina. La auxotrofia por la riboflavina nos permite en un medio carente de la misma seleccionar los transformantes que incorporaron el *cassette*, ya que el éste posee complementación de la auxotrofia por el gen de selección incluido (*riboB*⁺).

A su vez, las auxotrofías por el ácido p-aminobenzoico y piridoxina nos permiten comprobar que los transformantes que sean capaces de crecer sin riboflavina sean transformantes de la cepa triple deletada y no contaminantes (Figura 16).

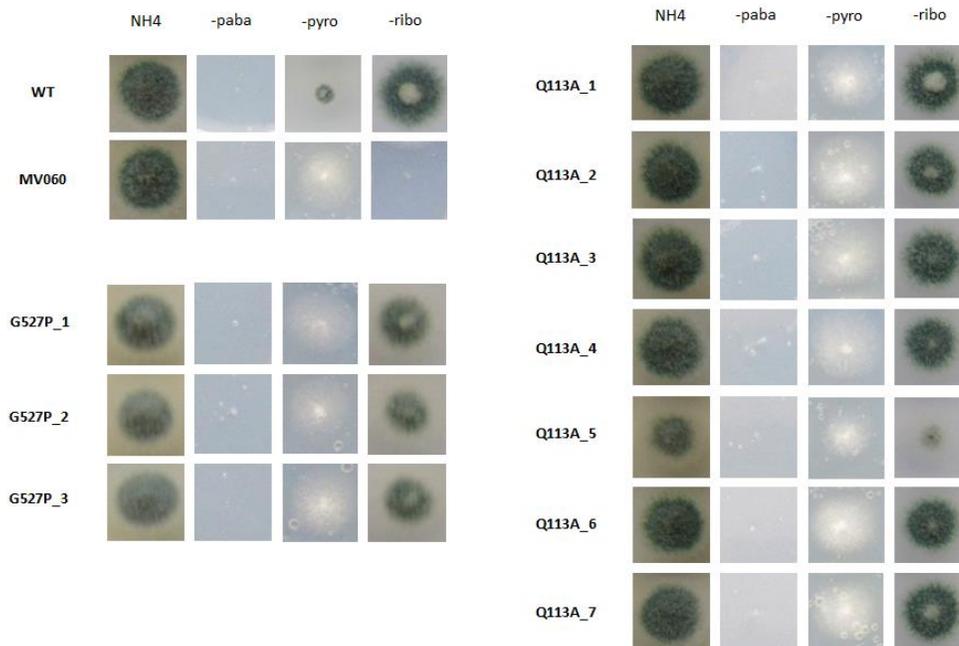


Figura 16. Selección de transformantes por auxotrofías. MV060: (*uapA*, *uapC*, *azgA*).

3.3.2 Verificación de secuencia

Para determinar si los transformantes que incorporaron el *cassette* poseen en el mismo la mutación deseada es necesario el análisis de la secuencia del gen *phU*. Para esto se extrajo el ADN genómico de los mutantes (Figura 17) y se amplificó el gen de *phU* con los *primers* FP2AN5ZF2 y Rib82seqR2 (Sección 6.2 Tabla 4) (Figura 18). Los amplicones fueron secuenciados con los *primers* externos AN5Zseq-F2 y ANgfpseq-R1 y con los *primers* internos PhU-qF7 y PhU-qR5 (Sección 6.2 Tabla 4). Las secuencias se comparan con la secuencia de *phU* WT (Figura 19). Se verifica que en ambos casos las mutaciones deseadas fueron introducidas exitosamente. Sin embargo, en todos los transformantes A120Q se encontró una mutación adicional en el nucleótido 1706 (adenina a guanina) que cambia el aminoácido 569 de glutamato a glicina debido a la mutación.

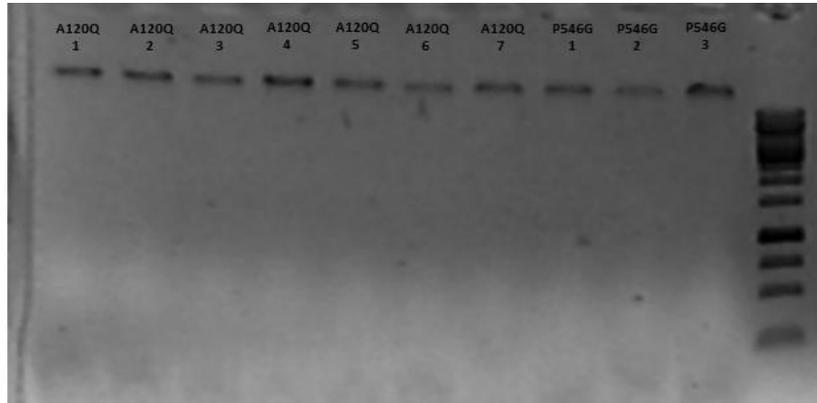


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de los transformantes

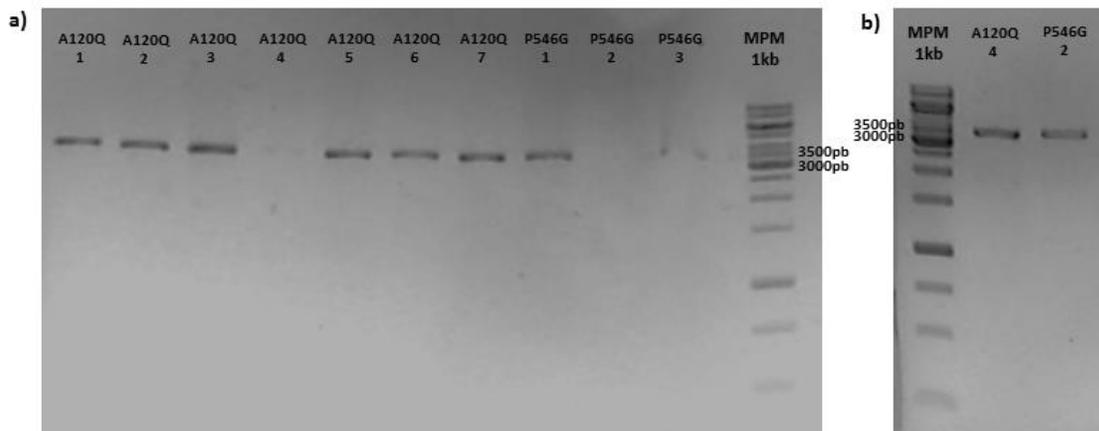


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para obtener el gen *phU* para enviar a secuenciar. a) Se obtiene un fragmento de ≈ 3300 pb para todos los mutantes excepto por A120Q_4 y P546G_2. b) Se repite la PCR para los casos que no dio, esta vez se obtienen fragmentos de ≈ 3300 pb para A120Q_4 y P546G_2.

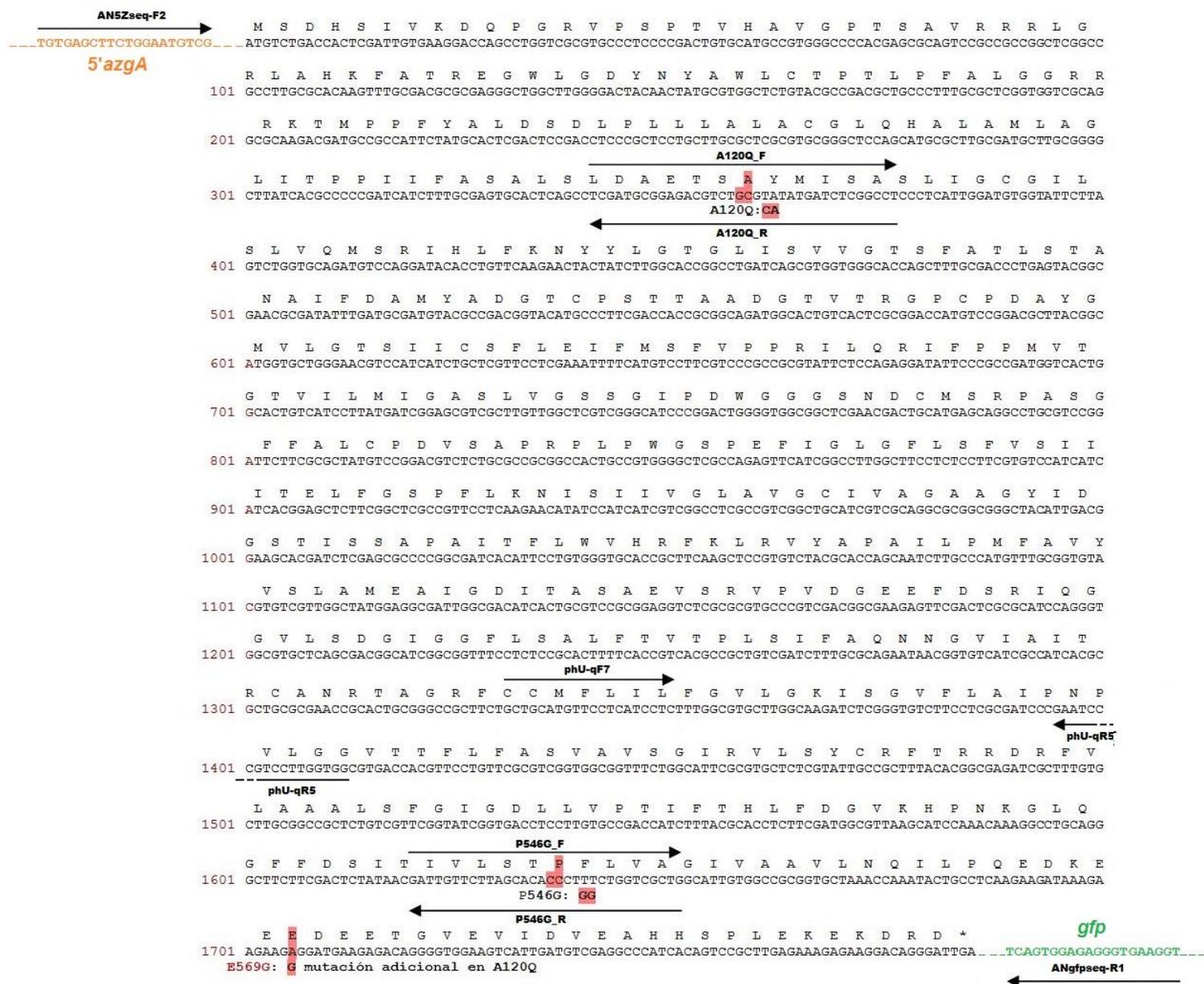


Figura 19. Análisis comparativo entre la secuencia de *phU* WT y las secuencias de A120Q y P546G. Se muestran los *primers* utilizados para la secuenciación y sobre las mutaciones los *primers* utilizados para la mutagénesis sitio dirigida.

3.3.3 Determinación del número de copias del gen

Se determinó el número de copias del gen *phU* presente en cada mutante mediante el método de PCR en tiempo real. Se utilizó como referencia el gen de la actina y como calibrador (cb) para el cálculo del número de copias la cepa AN20_*phU*28 (1 copia del gen *phU*). Se utilizaron como controles las cepas AN19_*phU*25, AN20_*phU*28, AN11_MV060 y la cepa silvestre (wt) (Sección 6.1).

A partir de las curvas de amplificación (Figura 20 a) se determinaron los ciclos umbral (Ct) (umbral de 0,04) para realizar los cálculos (Ecuación 1, sección 1.11). Se determinó que para cada uno de los mutantes hay una copia del gen *phU*, los valores obtenidos para las cepas *A. nidulans* WT y MV060 que no tienen el gen fue de $0,0 \pm 0,2$ y AN19_phU25 verificó tener 2 copias (valor obtenido 2,1) (Ver Anexo, Tabla 6).

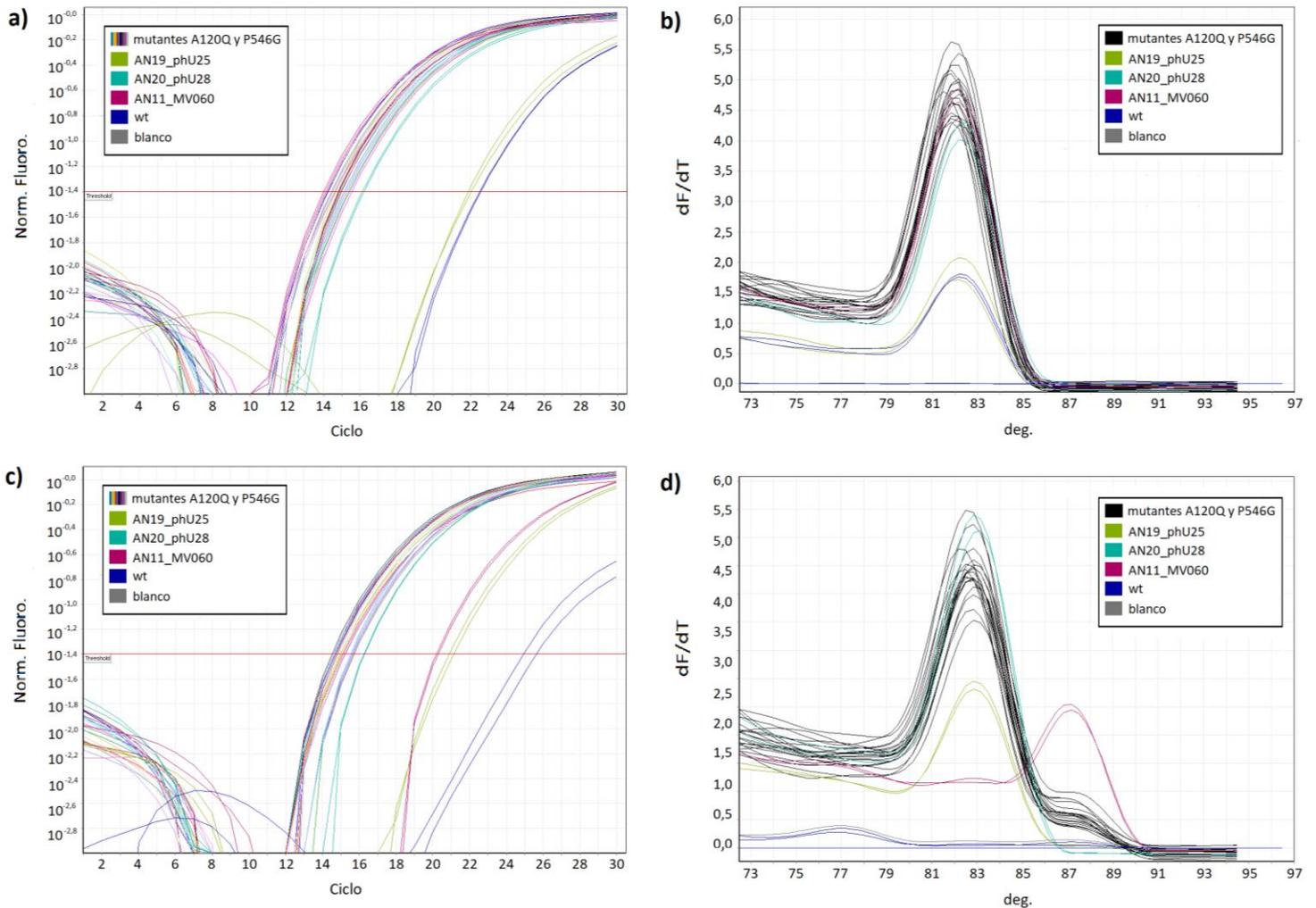


Figura 20. Curvas de amplificación: a) gen de referencia, actina b) gen de interés, *phU*. Curvas de *melting* c) gen de referencia, actina d) gen de interés, *phU*.

Mediante las curvas de *melting* (Figura 20 b) se determinaron los T_m de los productos de cada amplificación. Para los controles wt y el blanco no se observaron productos de amplificación. Se observó que el producto de amplificación de todos los mutantes tiene un T_m entre 80 y 86 que coincide con el de los controles phU25 y phU28. En todos los casos se observa un segundo pico de menor intensidad entre 85 y 90. Este pico aparece como único producto de amplificación y de mayor intensidad para el control MV060. Esta amplificación podría deberse a

la unión de los *primers* a una secuencia con menor complementariedad. Cuando suceden estas uniones inespecíficas de los *primers*, la MV060 al no poseer en su secuencia la zona específica de unión de los *primers* no amplifica el producto *phU* pero amplifica un segundo producto que es el que aparece representado en el pico entre 85 y 90. En las cepas portadoras de la secuencia *phU* 100% complementaria, los *primers* se unen preferentemente a éstas, mientras que en MV060 los *primers* se unen a la secuencia menos específica por no tener *phU* que compita por los mismos.

Como todos presentan este segundo producto de amplificación el mismo no interfiere en los cálculos del número de copias.

3.3.4 Análisis de transporte: Test de crecimiento

Se evaluó el crecimiento de las cepas mutantes en distintas condiciones, se incluyeron como control una cepa WT, la cepa AN11_MV060 (*uapA*⁻, *uapC*⁻, *azgA*⁻), AN19_tphU25 y AN20_tphU28 (transformantes de AN11_MV060 con el gen *phU* silvestre), AN21_tphZ3 y AN25_tphZ42 (transformantes de AN11_MV060 con el gen *phZ* silvestre), AN31_MV028 (transformante de AN11_MV060 con el gen *uapA*) y AN37_tAzgA140 (transformante de AN11_MV060 con el gen *azgA*) (Sección 6.1) (Figura 21).

En condiciones con todos los suplementos necesarios y amonio como fuente de nitrógeno se observó un crecimiento normal para todos los casos con excepción de A120Q_5 que presenta el mismo aspecto y misma esporulación que los otros transformantes pero que creció más lento.

La cepa WT puede transportar tanto ácido úrico como hipoxantina, por lo que puede crecer en presencia de las mismas como única fuente de nitrógeno. Esta cepa se ve afectada por el transporte de los análogos tóxicos de purinas, oxypurinol y 8-azguanina.

En ácido úrico como única fuente de nitrógeno se observó que crecen WT, MV028 (gen para *uapA*) y los transformantes que incorporaron un *cassette* con el gen de *phU*. Esto es esperable ya que UapA y PhU tienen la capacidad de transportar ácido úrico. Sin embargo se observó que los transformantes con la mutación P527G a pesar de haber incorporado el gen de *phU* no presentan crecimiento, esto permite plantear la hipótesis de que la mutación introducida afecta el transporte por la permeasa. Frente a oxypurinol (análogo tóxico transportado por PhU y UapA) se observaron los resultados contrarios. Como era de esperarse, las cepas que no transportan ácido úrico no se ven afectadas por el oxypurinol, pudiendo crecer normalmente.

Para los mutantes P546G se observó crecimiento en oxypurinol. Esto llevaría a decir que la mutación afecta la capacidad de transporte de PhU.

En hipoxantina como única fuente de nitrógeno se observó que solo los controles que poseen el transportador AzgA o PhZ tienen un fenotipo de crecimiento normal. En presencia de 8-azguanina (análogo tóxico transportado por PhZ y AzgA) se observó un fenotipo de crecimiento opuesto, confirmando que las cepas incapaces de transportar hipoxantina crecen sin problema en presencia del tóxico, mientras que las que transportaron hipoxantina se ven afectadas por la 8-azguanina por haberla ingresado mediante la permeasa.

El transformante A120Q_5 presenta problemas de crecimiento en todas las condiciones, lo cual puede interpretarse como alguna mutación adquirida fuera del gen de *phU* que afecta el crecimiento en general, ya que la secuenciación no revela mutaciones dentro del gen *phU* distintas a las de los demás transformantes de A120Q que presentan fenotipo de crecimiento normal.

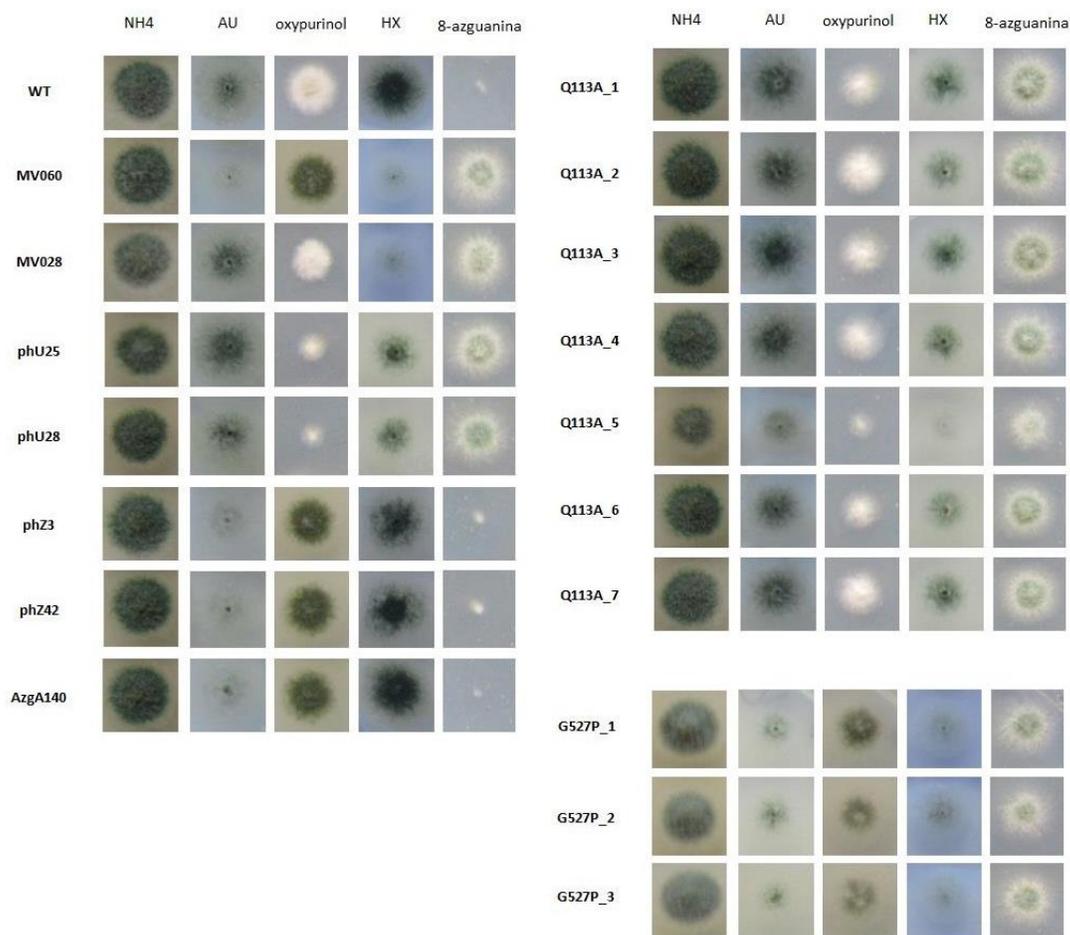


Figura 21. Test de crecimiento para las cepas control y mutantes obtenidos frente a diferentes condiciones: NH₄, Ácido úrico (AU), oxypurinol, Hipoxantina (HX) y 8-azguanina.

3.3.5 Localización subcelular de los transportadores: Microscopía de fluorescencia

El efecto que provocan las mutaciones introducidas en la localización subcelular del transportador se estudió mediante la fusión a la proteína verde fluorescente. Utilizando microscopía de fluorescencia se analizaron las 7 cepas con la mutación A120Q y las 3 cepas con P546G (Figura 22).

Para cada mutante se observaron entre 10-15 campos para cada condición (inducción y represión) siendo representativos del comportamiento general de la cepa. Al estudiar los transportadores mutados se observó que en presencia de amonio (represor) el comportamiento es el mismo que el del transportador silvestre (Barraco-Vega *et al.* 2017): La fluorescencia observada es citoplasmática, no se observa transportador asociado a la membrana.

En presencia de sustrato (ácido úrico) las cepas que presentan la mutación A120Q mostraron el mismo patrón del transportador silvestre: La fluorescencia se localiza en la membrana citoplasmática y hay un aumento de la fluorescencia en vacuolas. Sin embargo en el caso de las cepas P546G la presencia de sustrato no induce la localización del transportador en la membrana, el patrón de fluorescencia es similar al obtenido en presencia del represor.

Estos resultados indican que la mutación A120Q no afecta la localización subcelular del transportador *phU*, mientras que la mutación P546G impide la colocación de la proteína en la membrana. Esto último se podría deber a que la mutación provoca un cambio conformacional de la proteína y explicaría la incapacidad de las cepas con P546G para transportar ácido úrico.

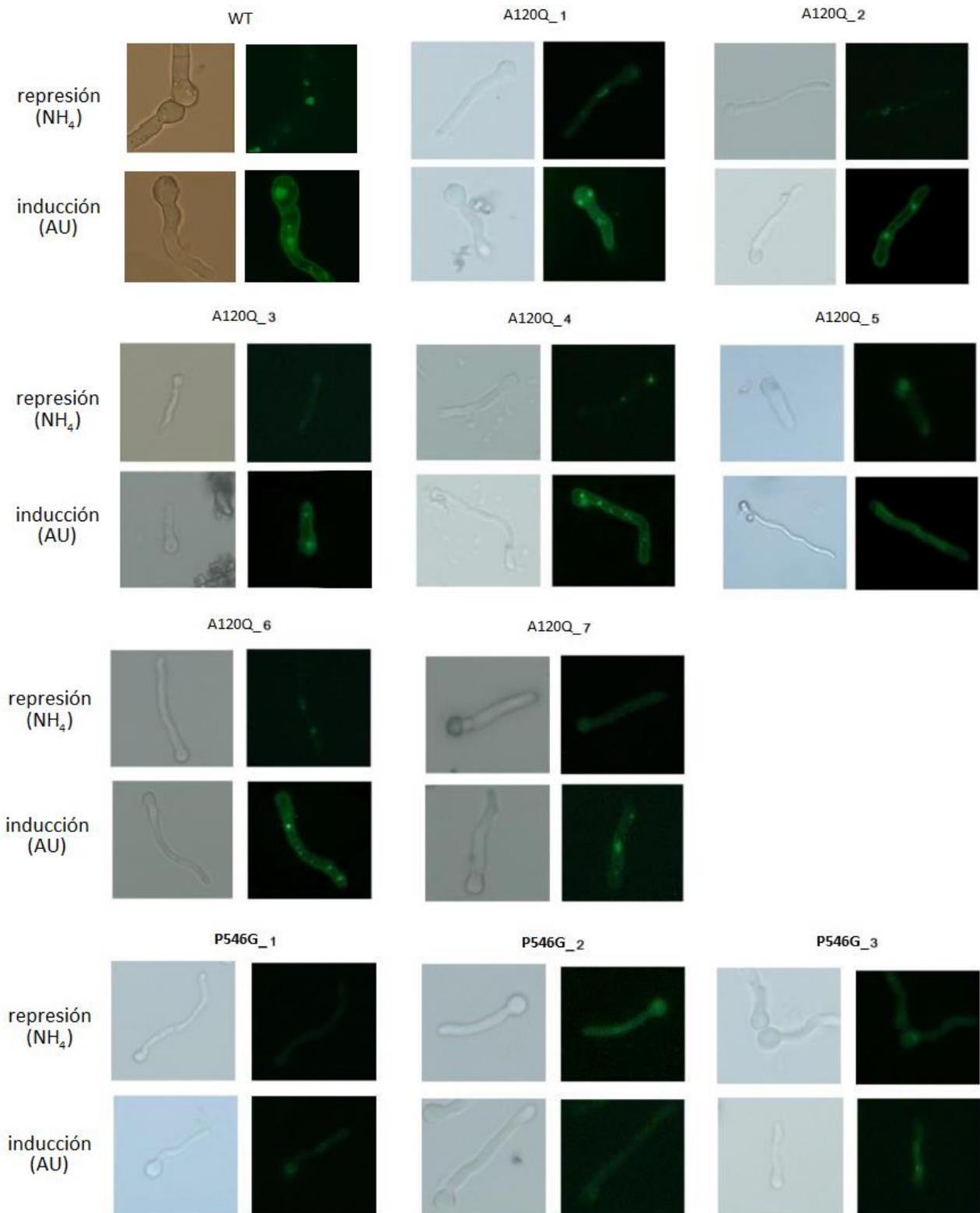


Figura 22. Resultados del análisis de la localización del transportador en condiciones de represión (NH₄) e inducción (AU) mediante microscopía de fluorescencia. Para cada condición se analizaron 10-15 campos, para todos los casos se observó un mismo comportamiento, seleccionando por lo tanto una imagen representativa de cada condición para cada cepa.

4. Discusión de resultados y conclusiones

Se construyeron 7 cepas portadoras de A120Q y 3 de P546G, y se verificó que todas tienen una única copia del gen *phU*. Para las demás mutaciones planteadas se introdujo la mutación en uno de los dos amplicones parciales del gen, en el fragmento 3' para S457A y en el fragmento 5' para V157M y R486A. Las condiciones ensayadas no permitieron obtener el fragmento restante para completar el *cassette*.

Las 7 cepas A120Q presentan la mutación adicional E569G. Estos doble-mutantes A120Q-E569G, se localizan en membrana y no muestran diferencias en el transporte respecto a PhU WT, lo que podría deberse a que ninguna de las dos mutaciones afecte la función de la proteína (mutaciones silenciosas) ó a que una mutación suprima el efecto de la otra (supresores intragénicos). El modelo estático de la estructura tridimensional de PhU, muestra que estos residuos se encuentran alejados entre sí, lo que estaría a favor de la primera hipótesis (mutaciones silenciosas). Por otra parte, el rol de los residuos Gln113 y Glu562 de UapA, topológicamente análogos a Ala120 y Glu569 de PhU respectivamente, se observa que:

- en UapA el residuo Gln113, se encuentra en una región bisagra putativa entre los dominios núcleo y de entrada, y tiene implicancia en la especificidad de reconocimiento de sustratos;
- Glu562, no se encuentra entre los residuos fundamentales para el correcto plegamiento, localización y función de UapA. Por lo que ambas hipótesis quedan pendientes de verificación.

La mutación P546G impide la colocación de la proteína en la membrana lo que explica la incapacidad de las cepas con P546G para transportar ácido úrico. Muy diferente es el rol de Gly527, residuo topológicamente análogo en UapA. En UapA, Gly527 se encuentra en la interface entre los dos dominios de la proteína cerca del sitio de unión al sustrato. Interacciona con los residuos Thr526 y Phe528 que tienen importancia en la especificidad de reconocimiento de sustrato y cinética de transporte.

5. Perspectivas

Generar modelos estructurales de estas mutaciones con las dinámicas correspondientes para analizar los residuos que contactan en la proteína silvestre y en los mutantes y predecir qué cambios podrían producirse en la estructura o interpretar los resultados obtenidos.

Estudiar por separado las mutaciones A120Q y E569G que permita definir si son supresores o mutaciones silenciosas.

Completar la construcción de los *cassettes* con las mutaciones restantes que no se obtuvieron durante esta tesina para su inserción en el mismo contexto genético y el posterior análisis correspondiente. Para así poder concluir sobre la relevancia de todos los residuos de PhU que en posiciones topológicamente equivalentes a los residuos homólogos en UapA, se encontraron pudieran ser de importancia en el plegamiento, localización subcelular y/o funcionamiento del transportador. En este sentido, se propone:

- rediseñar los *primers* usados en la amplificación de los fragmentos 5' para la mutación S457A y 3' para las mutaciones V157M y R486A, alejando la mutación del extremo 3' del *primer*,
- construir un ADN molde más limpio, mediante el clonado de las secuencias a amplificar en vectores por el método de *restriction-free cloning*. Esta estrategia se comenzó a desarrollar durante esta tesina, como se describe a continuación.

Construcción de ADN molde acotado a los fragmentos que se quieren amplificar mediante *Restriction-free cloning*

Clonado de fragmentos 5' y 3' para construcción de *cassettes phU**

El ADN genómico puede no ser muy eficiente como molde en reacciones de PCR por ejemplo en el caso de haber otras regiones con cierta homología con los *primers* donde estos puedan hibridar en diferentes lugares diluyéndose. Esta podría ser una de las razones de las dificultades para clonar algunos fragmentos componentes de los *cassettes* (Sección 3.1.1). Una forma de eliminar este factor es usar como molde las mismas secuencias clonadas en vectores.

El objetivo es entonces clonar las secuencias con *phU^t* que serán utilizadas como molde para la amplificación de los componentes 5' y 3' de *cassettes* para la generación de mutantes. Se construirán 2 vectores : un que contenga 5'z::*phU^t*, por inserción de 5'Z en un vector con *phU*; y otro que contenga *phU* silvestre ligado a *gfp::riboB+::3'Z*, por inserción de *phU^t* en un vector con *gfp::ribo::3'Z* (Figura 23).

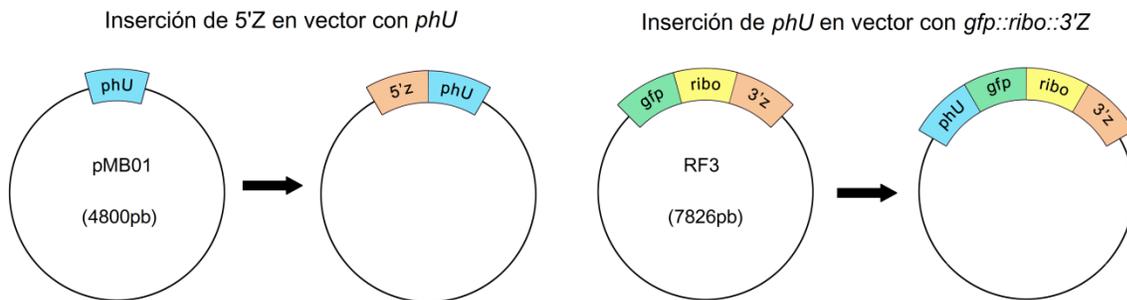
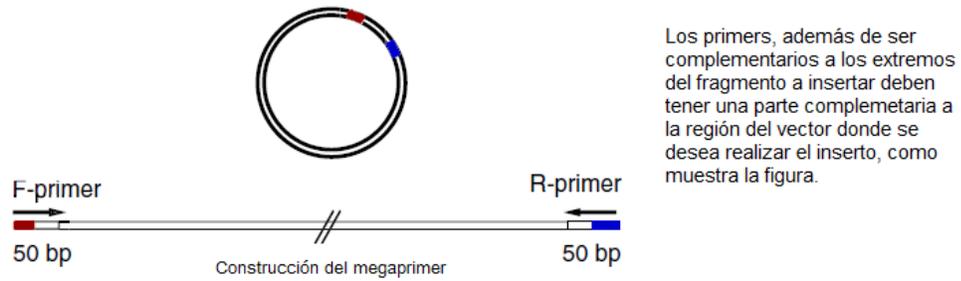


Figura 23. Construcciones a realizar mediante RF-cloning.

La construcción de los plásmidos se realiza por el método de *restriction-free cloning* (Figura 24), que consiste en la inserción de un fragmento de ADN en un plásmido sin la utilización de enzimas de restricción. El fragmento de interés se amplifica mediante *primers* diseñados para ser complementarios al fragmento de interés y a la región del vector donde se desea realizar la inserción. Así una vez obtenido el fragmento (*megaprimer*) tendrá en sus extremos regiones complementarias al plásmido que actuarán como *primers* para la inserción en el vector por PCR. Una vez realizada la PCR para la inserción se digiere la hebra parental del plásmido (metilada) con DpnI, luego el ADN se precipita con t-ARN para ser utilizado en la transformación (Fusinita van den Ent, Jan Löwe, 2005).

1: Región del vector donde se desea realizar el inserto, diseño de los primers para la construcción del megaprimer



2: Inserción mediante PCR convencional

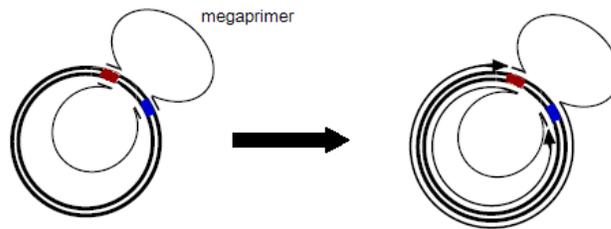


Figura 24. Esquema del método de *restriction-free cloning*. Extraído y modificado de Fusinita van den Ent, Jan Löwe (2005).

Inserción de 5'Z en vector con *phU*

Se amplifica el inserto 5'Z (*megaprimer* 5'Z) (Figuras 25 y 26 a) con los primers 5'Z-pgemF y 5'Z-phUR (Sección 6.2 Tabla 4). Se purifica el producto de las PCR, para eliminar los amplicones contaminantes de menor tamaño (450-500pb) (Figura 26 b).

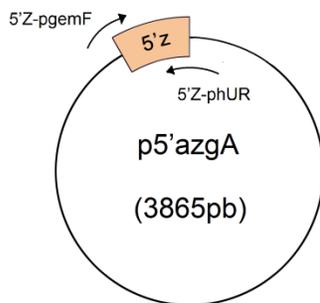


Figura 25. Esquema construcción *megaprimer* 5'Z.

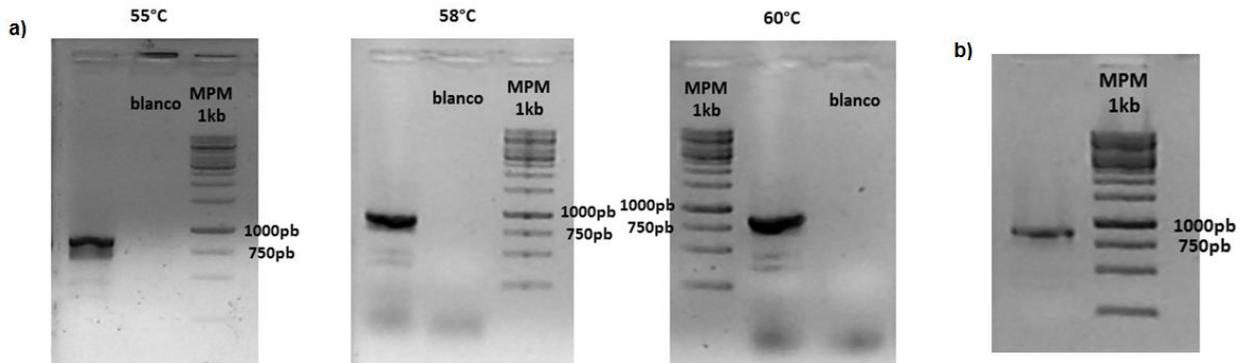


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa, PCR para la obtención del *megaprimer* 5'Z. a) Productos de amplificación con temperatura de *annealing* de 55, 58 y 60 °C, se obtuvo un fragmento de ≈ 900 . b) Purificación del *megaprimer* 5'Z ≈ 900 .

Para insertar el fragmento 5'Z en el vector con *phU*, se realiza una PCR usando como único *primer* el *megaprimer* purificado, se digiere con DpnI para eliminar los vectores molde y se transforma *E. coli* TOP10. Se aíslan 12 transformantes de un total de 87. Se extrae el ADN plasmídico de éstos 12 y se verifica la presencia de inserto amplificando con *primers* del vector: pCR21_ampF1 y pCR21_ampR1 (Sección 6.2 Tabla 4). Si el vector tiene el inserto el tamaño del producto de amplificación será de ≈ 3000 pb (≈ 800 pb *megaprimer* 5'Z y ≈ 2100 pb gen *phU*) y si el vector no tiene el inserto el tamaño será de ≈ 2100 pb correspondiente únicamente al gen *phU*.

Inserción de *phU* en vector con *gfp::riboB⁺::3'Z*

En este caso, se amplifica el *megaprimer: phU* con los *primers* phU-Fpgem y phU-gfpR (Figuras 27 y 28 a) (Sección 6.2 Tabla 4) y se purifica (Figura 28 b).

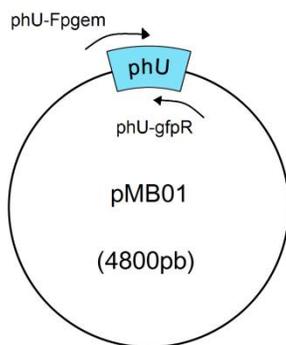


Figura 27. Esquema construcción *megaprimer phU*.

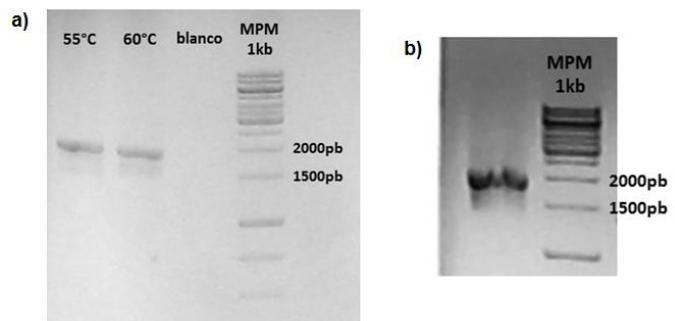


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a) *megaprimer phU* ≈ 1800 pb; b) *megaprimer* purificado.

Se realiza la PCR para la inserción del *megaprimer* en el vector que contiene *gfp::ribo::3'Z*, luego se digiere con DpnI y precipita con t-RNA para finalmente transformar *E. coli*. Una vez purificados los transformantes, se extrajo el ADN plasmídico y en este caso para verificar la presencia del inserto se usa PCR tiempo final con rampa en la etapa de elongación debido al

tamaño del inserto: ≈ 6000 pb correspondientes a *phU::gfp::riboB::3'Z*, y ≈ 4200 pb si *phU* no se insertó.

Debido a que los 12 y 18 transformantes analizados no contenían 5'z ni *phU* respectivamente, se repiten las PCR para la inserción de los *megaprimer* en los correspondientes vectores con el agregado de DMSO 10%. El análisis de nuevos transformantes obtenidos está en curso.

6. Materiales y métodos

6.1 Cepas de *A. nidulans*

Tabla 3. Cepas de *A. nidulans* utilizadas

Cepa	Genotipo	Origen
WT	<i>pabaA1</i>	Dra. Ana Ramón
AN11_MV060	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 riboB2 pyroA4</i>	Barraco-Vega, 2014
AN19_tphU25	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phU::gfp::riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN20_tphU28	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phU::gfp::riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN21_tphZ3	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phZ::riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN25_tphZ42	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phZ::gfp::riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN31_MV028	$\Delta azgA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN37_tAzgA140	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::azgA::gfp::riboB2</i>	Barraco-Vega, 2014
AN61_A120Q_1	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN62_A120Q_2	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN63_A120Q_3	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$ <i>pabaA1 pyroA4 \Delta azgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN64_A120Q_4	$\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrG^{AF} \Delta nkuA::argB$	Esta tesis

	<i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	
AN65_A120Q_5	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN66_A120Q_6	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN67_A120Q_7	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{A120Q}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN68_P546G_1	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{P546G}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN69_P546G_2	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{P546G}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis
AN70_P546G_3	<i>ΔazgAΔuapAΔuapC::pyrG^{AF} ΔnkuA::argB</i> <i>pabaA1 pyroA4 ΔazgA::phU^{P546G}::gfp::riboB2</i>	Esta tesis

Descripción del genotipo

pabaA1: mutación en el gen *pabaA* que codifica la sintasa del ácido para-aminobenzoico, genera auxotrofia por el mismo.

pyroA4: mutación del gen *pyroA* que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de piridoxina (vitamina B6), genera auxotrofia por la piridoxina.

riboB2: mutación en el gen *riboB*, que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de riboflavina (vitamina B2), genera auxotrofia por la riboflavina.

ΔazgA: deleción en el gen *azgA* que codifica el transportador AzgA, genera deficiencia en el crecimiento en hipoxantina como única fuente de nitrógeno y resistencia a la 8-azaguanina.

ΔuapA: deleción del gen *uapA* que codifica el transportador UapA, genera deficiencia en el crecimiento en ácido úrico y xantina como única fuente de nitrógeno y resistencia al oxypurinol.

ΔuapC::pyrG^{AF} : gen *uapC* que codifica el transportador UapC interrumpido por el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*.

ΔnkuA::argB : gen *nkuA* interrumpido por el gen *argB*. El gen *nku* codifica la subunidad 1 de la helicasa II, implicada en procesos de recombinación heteróloga, la deleción de este gen reduce considerablemente la frecuencia de integración de las secuencias foráneas en otros lugares del genoma y por tanto favorece la recombinación homóloga (Nayak *et al.*, 2006).

ΔazgA::phU::gfp::riboB2: es el gen *phU* que codifica el transportador PhU de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.

ΔazgA::phZ::gfp::riboB2: es el gen *phZ* que codifica el transportador PhZ de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.

ΔazgA::phZ::riboB2: es el gen *phZ* que codifica el transportador PhZ de *P. chrysosporium* fusionado al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.

ΔazgA::azgA::gfp::riboB2: gen *azgA* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*. Integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.

phU^{A120Q}: gen *phU* con una mutación en el aminoácido 113 que codifica para Q en vez de A

phU^{P546G}: gen *phU* con una mutación en el aminoácido 527 que codifica para G en vez de P

6.2 Primers

Tabla 4. Primers utilizados. Las letras en minúscula indican las mutaciones introducidas.

Primer	Secuencia (5'-3')	Uso
FP2AN5ZF2	GTGAGTTTGGCGCTAGCAATG	-Construcción de <i>cassettes</i> mediante PCR de fusión -Amplificación de <i>phU</i> para la secuenciación
FP5AN3ZR2	ATGGTTTGGCATTCTCTTGG	Construcción de <i>cassettes</i> mediante PCR de fusión
FP1AN5ZF1	TGTAGACCATTCTGATTGATTGAA	-Obtención del extremo 5'Z de mutantes <i>phU</i> -Obtención del extremo 5'Z de <i>uapA</i>
FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG	-Obtención del extremo 3'Z de mutantes <i>phU</i> -Obtención del extremo 3'Z de <i>uapA</i>
A120Q_F	TCGATGCGGAGACGTCTcaGTATATGATCTCGGCCT	Obtención del fragmento 3' con mutación A120Q en <i>phU</i>
A120Q_R	AGGCCGAGATCATATActgAGACGTCTCCGCATCGA	Obtención del fragmento 5'Z con mutación A120Q en <i>phU</i>
V157M_F	CCTGATCAGCGTGaTGGGCACCAGCTTTGC	Obtención del fragmento 3' con mutación V157M en <i>phU</i>

V157M_R	GCAAAGCTGGTGCCCA t CACGCTGATCAGG	Obtención del fragmento 5'Z con mutación V157M en <i>phU</i>
S457A_F	CGTGCTTGGCAAGATC gCc GGTGTCTTCCTC	Obtención del fragmento 3' con mutación S457A en <i>phU</i>
S457A_R	GAGGAAGACACC gGc GATCTTGCCAAGCACG	Obtención del fragmento 5'Z con mutación S457A en <i>phU</i>
R486A_F	TGGCGGTTTCTGGCATT gc CGTGCTCTCGTATTGC	Obtención del fragmento 3' con mutación R486A en <i>phU</i>
R486A_R	GCAATACGAGAGCAC Ggc AATGCCAGAAACCGCCA	Obtención del fragmento 5'Z con mutación R486A en <i>phU</i>
P546G_F	GATTGTTCTTAGCAC agg CTTTCTGGTCGCTG	Obtención del fragmento 3' con mutación P546G en <i>phU</i>
P546G_R	CAGCGACCAGAAAG cc TGTGCTAAGAACAATC	Obtención del fragmento 5'Z con mutación P546G en <i>phU</i>
5'Z-pgemF	GGAATTCGATTGTAGACCATTCTGATTGATTGAA	Obtención del <i>megaprimer</i> 5'Z para la inserción en vector con <i>phU</i>
5'Z-phUR	CGAGTGGTCAGACATGCTGTCTGTGAGG	
phU-Fpgem	GGAATTCGATATGTCTGACCACTC	Obtención del <i>megaprimer phU</i> para la inserción en vector con <i>gfp::ribo::3'Z</i>
phU-gfpR	CCTGCACCAGCTCCCAATCCCTGTCC	
pCR21_ampF1	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Verificación de la inserción del <i>megaprimer</i> en el vector
pCR21_ampR1	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	
FP3- <i>uapA</i>	TGAATGGATGGAGTTGTCCATGCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	Obtención del extremo 5'Z de <i>uapA</i>
AN <i>uapA</i> -cF1	ATGGACAACCTCCATCCATTCA	Obtención del gen <i>uapA</i> para armar <i>cassette uapA</i>
An <i>uapA</i> -cR1	CTAAGCCTGCTTGCTCTGATACT	
FP4GFP <i>uapA</i> 2	AGTATCAGAGCAAGCAGGCTGGAGCTGGTGCAGGCG	Obtención del extremo 3'Z para armar <i>cassette uapA</i>
Rib82seqR2	CTGTTGCCAGGTGAGGGTAT	Amplificación de <i>phU</i> para la secuenciación
AN5Zseq-F2	TGTGAGCTTCTGGAATGTCCG	Secuenciación de los transformantes (<i>primers</i> externos)
ANGfpseq-R1	ACCTTCACCTCTCCACTGA	
PhU-qF7	GCTGCATGTTCTCATCCTC	-Secuenciación de los transformantes (<i>primers</i> internos) -qPCR
PhU-qR5	CCACCAAGGACGGGATTC	
ANactin_qF1	TCCCGCCTTCTACGTCTCTA	qPCR
ANactin_qR1	TGGGTAACACCATCACCAGA	

6.3 Vectores

Tabla 5. Vectores utilizados

Vector	Características	Uso
p5'azgA	pGemT easy::5'azgA (3865 pb)	-Obtención del <i>megaprimer</i> 5'azgA para la inserción por <i>RF-cloning</i> en pMB01 -Obtención del 5'azgA para la construcción del <i>cassette</i> de <i>uapA</i>
pMB01	pGemT easy::ADNc phU (4800 pb)	-Obtención del <i>megaprimer</i> <i>phU</i> para la inserción por <i>RF-cloning</i> en RF3 -Obtención del extremo 3'azgA unido a <i>ribo</i> y <i>gfp</i> para la construcción del <i>cassette</i> de <i>uapA</i>
RF3	pCR2.1::gfp::riboB2::3'azgA (7826 pb)	Inserción de <i>phU</i> por <i>RF-cloning</i>
<i>uapA</i> PGEM	pGemT easy:: <i>uapA</i> (4791 pb)	Obtención del gen <i>uapA</i> para la construcción del <i>cassette</i> de <i>uapA</i>

6.4 Construcción de *cassettes*

Todas las PCR se llevaron a cabo en el termociclador Corbett (CG1-96) y fueron purificadas mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit, reemplazando el buffer de elución EB por buffer TE 1x.

Buffer Tris EDTA (TE) 10x: 10 mM Tris HCl pH=7,6, 1 mM de EDTA ph=8. Se esteriliza mediante calor húmedo, 15 minutos a 121°C.

Electroforesis en gel de agarosa

Todos los productos de PCR se corren en gel de agarosa.

Todos los geles se realizaron con buffer TBE 0,5X y 1% agarosa (m/v) con good View (0,5 µg/mL) como agente intercalante. Las muestras se sembraron con buffer de carga 5x. Se utilizó el marcador de peso molecular geneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).
Buffer Tris Borato (TBE) 10x: 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0,5 M pH=8 en 1 L de agua destilada.

Buffer de carga 5x: 0,25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua.

El gel se corrió a 100 mV durante: 40 minutos para pesos moleculares ≤2000 pb, 60 minutos para pesos moleculares entre 2000-4000 pb y 90 minutos para pesos moleculares ≥4000 pb.

6.4.1 Mutagénesis sitio dirigida

PCR para la obtención de los fragmentos 5'

Los fragmentos 5' para la formación de los *cassettes* con la mutación se obtuvieron mediante PCR tiempo final. En un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos FP15ZF1 y el *primer* reverse correspondiente a cada mutación (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). ADN molde: 25ng de ADN genómico de la cepa AN_20tphU28. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 5 minutos a 72°C, con una elongación final de 5 minutos a 72°C.

PCR para la obtención de los fragmentos 3'

Los fragmentos 3' para la formación de los *cassettes* con la mutación se obtuvieron mediante PCR tiempo final con rampa en la etapa de elongación. En un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos FP6AN3ZR1 y el *primer* forward correspondiente a cada mutación (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). ADN molde: 25ng de ADN genómico de la cepa AN_20tphU28. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 7 minutos a 72°C, a partir del ciclo 11 se agregan 20 segundos más en cada ciclo de elongación a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

PCR para fusión (Szewczyk et al., 2006)

Una vez obtenidos los fragmentos 5' y 3' los mismos se unen mediante PCR de fusión (Ver 2.2.1). La misma se realizó en un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos FP2AN5ZF2 y FP5AN3ZR2 (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). ADN molde: 30 ng fragmento 5' y 30 ng fragmento 3'. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 8 minutos a 72°C, a partir del ciclo 11 se agregan 20 segundos más en cada ciclo de elongación a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

6.4.2 Construcción del *cassette* de *uapA*

5'UTR *azgA*

El fragmento 5' para la formación del *cassette* de *uapA* se obtuvo mediante PCR tiempo final. En un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos FP15ZF1 y FP3-*uapA* (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde el vector p5'*azgA*. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 2 minutos a 72°C, con una elongación final de 7 minutos a 72°C.

uapA

El fragmento con el gen de *uapA* para la formación del *cassette* de *uapA* se obtuvo mediante PCR tiempo final. En un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos AN*uapAcF1* y AN*uapAcR1* (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde el vector *uapA* PGEM. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 3 minutos a 72°C, con una elongación final de 5 minutos a 72°C.

3'UTR *azgA* unido a *riboB2* unido a *gfp*

El fragmento con el gen de *uapA* para la formación del *cassette* de *uapA* se obtuvo mediante PCR tiempo final con ciclo de fusión. En un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$ y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos AN*uapAcF1* y AN*uapAcR1* (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde el vector RF3. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 5 minutos a 72°C, a partir del ciclo 11 se agregan 20 segundos más en cada ciclo de elongación a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

PCR para fusión

Una vez obtenidos los fragmentos 5', *uapA* y 3', los mismos se unen mediante PCR de fusión (Ver 3.1.2) en un volumen final de 50 μ L con 10 μ L de buffer KapaHiFi 5x (con $MgCl_2$ incorporado) (KapaBiosystems), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega) y 1,5 μ L de cada *primer*. Siendo estos FP2AN5ZF2 y FP5AN3ZR2 (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima KAPA HiFi (KapaBiosystems). ADN molde: 40 ng 5'Z, 40 ng *uapA* y 40 ng 3'Z. Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C seguido de 25 ciclos de 20 segundos a 98°C, 30 segundos a 59°C y 8 minutos a 72°C, a partir del ciclo 11 se agregan 20 segundos más en cada ciclo de elongación a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

6.4.3 Restriction-free cloning

6.4.3.1 Inserción de 5'Z en vector con *phU*

PCR para la obtención del *megaprimer* 5'Z

Se realiza una PCR tiempo final en un volumen final de 25 μ L con 2,5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 1,25 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 1 μ L de $MgCl_2$ y 1 μ L de cada primer. Siendo estos 5'Z-pgemF y 5'Z-phUR (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde 20 ng de vector p5'azgA (Sección 6.3 Tabla 5). Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utiliza el siguiente programa de PCR. Desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Por último una extensión final de 1 minuto a 72°C.

PCR para la inserción del *megaprimer* en el vector

Se realiza una PCR tiempo final en un volumen final de 50 μ L con 5 μ L de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μ L de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μ L de $MgCl_2$, 100 ng de *megaprimer* y 0,25 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde 20 ng de vector pMB01 (Sección 6.3 Tabla 5). Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utiliza el siguiente programa de PCR. Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 8 minutos a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

6.4.3.2 Inserción de *phU* en vector con *gfp::ribo::3'Z*

PCR para la obtención del *megaprimer phU*

Se realiza una PCR tiempo final en un volumen final de 25 μL con 2,5 μL de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 1,25 μL de dNTPs 10 mM (Promega), 1 μL de MgCl_2 y 1 μL de cada *primer*. Siendo estos *phU-Fpgem* y *phU-gfpR* (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,25 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde 20 ng de vector pMB01 (Sección 6.3 Tabla 5). Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utiliza el siguiente programa de PCR. Desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C. Por último una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Inserción del *megaprimer* en el vector

Se realiza una PCR tiempo final en un volumen final de 50 μL con 5 μL de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 2,5 μL de dNTPs 10 mM (Promega), 2 μL de MgCl_2 y 100 ng de *megaprimer* 0,5 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde 20 ng de vector RF3 (Sección 6.3 Tabla 5). Se realiza un blanco sin ADN molde. Se utiliza el siguiente programa de PCR. Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 10 minutos a 72°C. Por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

6.4.3.3 Digestión con DpnI

Una vez realizadas las PCR para la inserción de los *megaprimers* en sus correspondientes vectores, la hebra parental de cada vector se elimina mediante digestión con DpnI (Thermo Scientific). La misma se realiza en un volumen de 20 μL con 2 μL de buffer Tango, 6 μL de agua miliQ, 10 μL del ADN producto de la PCR y 2 μL de DpnI (10 U/ μL). Se incuba durante dos horas a 37°C.

6.4.3.4 Precipitación de ADN con t-ARN (Fusinita van den Ent, Jan Löwe, 2005)

5 μL del ADN a precipitar, 5 μL de t-ARN 0,2ng/ μL (Invitrogen), 10 μL de agua miliQ y 50 μL de EtOH absoluto. Se centrifuga 20 minutos a 13000g a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con 100 μL de EtOH 70%. Se centrifuga nuevamente 20 minutos a 13000g a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se deja secar. Se resuspende el pellet en 2 μL de agua miliQ.

6.4.3.5 Transformación bacteriana

Cepa de *Escherichia coli* utilizada: genotipo TOP10 F– *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

Medios para *E. coli*

Para cultivos sólidos a los medios se les agrega 1.5 % de agar.

Esterilización por calor húmedo: 15 minutos a 121°C.

Medio Luria-Bertani (LB): En un litro de agua destilada se añaden 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, se ajusta el pH a 7.

Medio Luria-Bertani con ampicilina (LB amp): Se le agrega al medio 200 μ g de ampicilina/mL de medio. Stock ampicilina = 100 mg/mL.

Medio Luria-Bertani (LB) para células competentes: En un litro de agua destilada se añaden 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl, se ajusta el pH a 7.

Medio SOB: En un litro de agua destilada se añaden 20 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl, se ajusta el pH a 7.

Medio SOC: A 10 mL de SOB enfriado a menos de 60°C se le agregan 50 μ L de MgCl₂ 2 M y 200 μ L glucosa 1 M.

Preparación de células competentes

Se realizan dos precultivos de células TOP10 *over night* a 37°C con agitación 100 rpm en 4 mL de LB. Se inoculan con 2,5 mL de precultivo 2 erlenmeyer con 250 mL de LB y se incuba a 37°C a 300 rpm. Se mide la absorbancia hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0,5 y 0,7. Se transfiera cada cultivo a un tubo de centrifuga de 500 mL y se deja en hielo durante 20 minutos. Luego se centrifuga 15 minutos a 4°C a 4000g. Se elimina el sobre nadante y se resuspende en 1 volumen de glicerol 10%. Se centrifuga nuevamente 15 minutos a 4°C a 4000g. Se elimina el sobre nadante y se resuspende en 1/2 volumen de glicerol 10%. Se centrifuga 15 minutos a 4°C a 4000g. Se elimina el sobre nadante y se resuspende en 1/25 volumen de glicerol 10%. Se juntan las células en un solo tubo y se centrifuga 15 minutos a 4°C a 4000g. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 2 mL de glicerol 10%. Se alícuota en eppendorfs 50 μ L de células. Se congela en N₂ líquido y se almacena a -70°C.

Transformación bacteriana

Se descongelan las células en hielo. Se agrega ADN (previamente precipitado con t-ARN) menor a 1/10 del volumen de células. Se deja un minuto en hielo y se transfiere la mezcla a la celda. Se seca la celda por fuera y se coloca en el electroporador (equipo MicroPulser TM BIO-RAD). Se utiliza el programa para bacterias Ec2 que corresponde a una descarga de 5 ms de 2,5-3 kV. Se electropora e inmediatamente se agrega 1mL de solución SOC. Se mezcla por inversión. Se incuba una hora a 37°C. Se transfiere a eppendorf y se plaquea en LB amp una cantidad adecuada para la obtención de colonias aisladas, el resto se almacena a 4°C. Se debe realizar un blanco sin ADN el cual se plaquea en LB amp como control de contaminación y en LB como control de viabilidad.

6.4.3.6 Extracción de ADN plasmídico

Solución I: 10 mM EDTA pH=8, 25 mM Tris-HCl pH=8

Solución II: 1% SDS, 0,2 M NaOH

Solución III: 60 mL KAc 5 M, 11,5 mL HAc glacial, 28,5 mL H₂O

TE + ARNasa: 1 mL TE + 1 µL RNAsa (10 mg/mL)

Se realiza un cultivo *over night* a 37°C en 3 mL de LB con ampicilina, se colocan 1,5 mL en un eppendorf y se centrifuga 1-2 minutos a 9000 rpm. Se descarta el sobrenadante. Se colocan los 1,5 mL restantes y se vuelven a centrifugar 1-2 minutos a 9000 rpm. Se descarta el sobrenadante. Se agrega 100 µL de solución I, se vortexea y se deja 5 minutos en hielo. Se agrega 200 µL de solución II, se mezcla por inversión y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 150 µL de solución III, se mezcla por inversión y se deja 15-20 minutos en hielo. Se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 12000 rpm. Se recupera el sobrenadante y se precipita con 1 mL de EtOH absoluto a temperatura ambiente. Se vortexea y se centrifuga inmediatamente 15 minutos a 4°C a 12000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se añade 50 µL de TE + ARNasa. Se incuba 5 minutos a 37°C, se vortexea y se incuba nuevamente 10-15 minutos a 37°C. Se agrega 30 µL de PEG 20% NaCl 2,5 M. Se vortexea y se deja una hora en hielo. Se centrifuga 15-20 minutos a 12000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con 500 µL de EtOH 70%. Se centrifuga 5 minutos a 6000 rpm, se descarta sobrenadante y se deja secar el pellet. Una vez seco se resuspende en 30 µL de agua miliQ.

Se siembran 3 μL del ADN extraído de cada transformante en un gel de agarosa en las condiciones ya descritas. Verifica si la extracción fue exitosa y las condiciones del plásmido extraído.

6.4.3.7 PCR para la verificación del inserto

Se realiza una PCR para determinar si el inserto fue realizado con éxito. En un volumen de 5 μL con 0,5 μL de buffer Taq invitrogen 10x (Thermo Scientific), 0,5 μL de dNTPs 10 mM (Promega), 0,15 μL de MgCl_2 y 0,25 μL de cada *primer*, siendo estos pCR21_ampF1 y pCR21_ampR1 (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,05 U de enzima Taq invitrogen (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde el plásmido al que se le quiere verificar la inserción y se hace un control con el plásmido sin el inserto. Se utiliza el siguiente programa de PCR. Una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C y 7 minutos a 72°C. Por último una extensión final de 1 minuto a 72°C. Si el inserto fue realizado con éxito se observará un producto correspondiente al tamaño del fragmento insertado y de mayor tamaño que el producto del plásmido control.

6.5 Medios y soluciones para *A. nidulans*

6.5.1 Medios de cultivo

Para cultivos sólidos a los medios se les agrega 1.5 % de agar.

Esterilización por calor húmedo: 15 minutos a 121°C.

Esterilización por filtración: filtro de 0,25 μm .

Los medios se preparan y se utilizan según lo recomendado en Pontecorvo *et al.*, 1953.

Solución de sales: En un litro de agua destilada se agregan 26 g de cloruro de potasio, 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 76 g fosfato de potasio monobásico y 50 mL de solución de elementos traza. No se esteriliza mediante calor húmedo, se le agrega 2 mL de cloroformo como conservante. Se almacena a 4°C.

Solución de elementos traza: En un litro de agua destilada se agregan 40 mg de borato de sodio decahidratado, 400 mg de sulfato de cobre pentahidratado, 800 mg de fosfato férrico dihidratado, 800 mg de sulfato de manganeso dihidratado, 800 mg de molibdato de sodio

dihidratado y 8 g de sulfato de zinc heptahidratado. Se esteriliza mediante calor húmedo y se almacena a 4°C.

Solución de casaminoácidos: En un litro de agua destilada se agregan 150 g de caseína hidrolizada. Se esteriliza mediante calor húmedo y se almacena a 4°C.

Solución de vitaminas: En un litro de agua destilada se agregan 50 mg de tiamina-HCl, 10 mg de biotina, 100 mg de ácido nicotínico, 200 mg de pantotenato de calcio, 50 mg de piridoxina-HCl, 100 mg de riboflavina y 500 mg ácido p-aminobenzóico. Se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C.

Medio mínimo (MM): En un litro de agua destilada se agregan 20 mL de solución de sales y 10 g de glucosa, se ajusta el pH a 6,8 con NaOH. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Observación: es necesario el agregado de una fuente de nitrógeno y de suplementos según las auxotrofías de la cepa de trabajo.

Medio mínimo sin fosfato (MM-P): Igual que MM pero la solución de sales y elementos traza se prepara sin fosfato.

Medio completo (MC):

En un litro de agua destilada se agregan 20 mL de solución de sales, 10 mL de solución de vitaminas, 10 mL de solución de casaminoácidos, 10 g de glucosa (dextrosa), 2 g peptona y 1 g de extracto de levadura, se ajusta el pH a 6,8 con NaOH. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Observación: no es necesario el agregado de suplementos para las cepas de trabajo.

Medio para la regeneración de protoplastos (isosmótico):

En un litro de agua destilada se agregan 20 mL solución de sales, 10 g de glucosa y 342,3 g de sacarosa, se ajusta el pH a 6,8 con NaOH. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Observación: es necesario el agregado de una fuente de nitrógeno y de suplementos según las auxotrofías de la cepa de trabajo.

6.5.2 Suplementos para *A. nidulans*:

Se esterilizan mediante calor húmedo y se almacenan a 4°C a menos que se indique lo contrario.

Fuentes de nitrógeno:

Purinas: Ácido úrico (AU) e hipoxantina (HX). Se agregan directamente al medio antes de usar (0.1 mg/mL).

Tartrato de amonio (NH₄): 92 g en 1 L de agua destilada. Uso 1:100.

Nitrato de sodio (NO₃): 81 g en 100 mL de agua destilada Uso: 1:100.

Suplementos auxotróficos:

Ác. p-aminobenzoico (paba): 20 mg en 100 mL de agua destilada. Uso 1:100.

Piridoxina HCl (pyro): 500 mg en 100 mL de agua destilada. Uso 1:100.

Biotina: 10 mg en 100 mL de agua destilada. Uso 1:100.

Riboflavina (ribo): 25 mg en 100 mL de agua destilada. Se almacena en oscuridad. Uso 1:100. Se esteriliza por filtración.

Análogos de purinas tóxicos:

Oxypurinol: 0.152 g en 100 mL de agua destilada. Uso 1:100 Observación: se utiliza con nitrato como fuente de nitrógeno.

8-azaguanina: 1 g en 100 mL de agua destilada alcalinizada con 5 gotas de NaOH 1M. Uso 1:100 Observación: se utiliza con amonio como fuente de nitrógeno (la mitad de la concentración).

6.6 Transformación de *A. nidulans*

Soluciones

B - 1,2 M MgSO₄, 10 mM ortofosfato (se lleva a pH 5,8), se esteriliza por filtración

D - 0,6 M sorbitol, 100 mM Tris HCl, pH 7,5

E - 1 M sorbitol, 10 mM Tris HCl, pH 7,5

G - 0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂

PEG - 0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂, 75 mM polietilenglicol

6.6.1 Producción de protoplastos

Se inoculan con una suspensión de conidias de la cepa AN11_MV060 (2 placas confluentes en 15 mL de Tween -4 (0,0001% Tween 80)) 400 mL de medio mínimo con el agregando de los suplementos que correspondan. Se incuba a 28°C a 140 rpm durante 14 horas, se sigue el cultivo al microscopio hasta observar germinación de las esporas. Luego se filtra el micelio a través de blutex, se lava con agua estéril y se seca entre hojas de papel estériles. Se pesa el micelio seco por diferencia en un falcon estéril y se resuspende en solución B (10 mL/g de micelio), se homogeniza por vortex y se transfiere a un matraz estéril. Se agregan 3-7 g de BSA/g de micelio y 300-400 mg de glucanex/g de micelio. Se incuba durante 1-2 horas a 30°C a 100rpm, se sigue la formación de protoplastos al microscopio. Se transfiere la suspensión de protoplastos a tubos corex estériles y se vortexea suavemente. Se agrega lentamente por la pared del tubo un volumen igual de solución D, se observa la formación de dos capas. Los tubos deben mantenerse en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 6000 rpm a 14°C. Los protoplastos forman una capa blanca en la interfase que se transfiere con pipeta Pasteur estéril a un nuevo tubo corex estéril. Se agregan 5 mL de solución E para lavar y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5 mL de solución G. Se realiza el recuento en cámara de Neubauer. Se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los protoplastos en la cantidad necesaria de solución G para obtener una concentración de $2-5 \times 10^7$ protoplastos/100 μ L.

6.6.2 Transformación

A 100 μ L de protoplastos se agrega 250 ng de ADN (volumen igual o menor a 15 μ L). Se debe hacer un blanco sin ADN. Se homogeniza por vortex 6-8 veces por 1 segundo a máxima velocidad y se agrega 50 μ L de solución PEG recién filtrada (filtro de 0,45 μ m) y se homogeniza por vortex 3-4 veces por 1 segundo a máxima velocidad. Se deja en hielo durante 25 minutos. Luego se agrega 1 mL de solución PEG y se mezcla con micropipeta por lo menos 10 veces, se deja a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se plaquea el volumen total de la transformación en placas de medio mínimo para la recuperación de protoplastos con los suplementos que correspondan. Se incuba a 37°C hasta la visualización de colonias (4-5 días).

6.7 Purificación de los transformantes

Con un escarbadiante se pica la colonia aislada a purificar y se resuspenden las conidias en 1 mL de Tween -4 y se homogeniza mediante vortex. Se plaquean 100 μ L en MM con las auxotrofías que correspondan (-ribo) y se incuba a 37°C durante 2 días hasta observar crecimiento. Se deben obtener colonias aisladas. De no ser así se realiza una dilución de la suspensión de conidias en Tween -4 y se plaquea nuevamente. Se realizan las diluciones necesarias hasta la obtención de colonias aisladas. Una vez obtenidas colonias aisladas se pica una colonia y se inocula por picadura una placa de MM con las auxotrofías correspondientes (-ribo) y se deja crecer durante 2-3 días a 37°C.

6.8 Extracción de ADN de *A. nidulans*

Se extrae el ADN de los transformantes.

Soluciones

Buffer de extracción- 1% SDS, 1 mM EDTA, 0,2 M Tris HCl pH 7,5
TE-ARNasa- 1 volumen de TE, 1/100 volumen de ARNasa (10 mg/mL)

Con una suspensión de conidias en Tween -4 de una placa confluyente, se inocula 100 mL de medio mínimo con los suplementos que correspondan y una fuente de nitrógeno. Se incuba a 37°C a 100 rpm durante 24 horas. Se filtra el micelio a través de blutex, se lava con agua estéril y se seca entre hojas de papel estériles. Se congela con N₂ líquido y se pulveriza. Se transfieren 100-200 mg de micelio pulverizado a un eppendorf de 2 mL. Se agrega 900 μ L de buffer de extracción, se vortexea y se pone 5-10 minutos en hielo. En campana se agrega 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se vortexea y se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se transfiere a eppendorf de 2 mL. Se agrega 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), se vortexea y se centrifuga 2-5 minutos a 12000 rpm. Se recupera la fase acuosa, se precipita con 1/10 volumen de NaAc 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de EtOH 95%. Se deja 20 minutos en hielo. Se centrifuga 10-15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se descarta el sobrenadante, se lava el pellet con 1 mL de EtOH 70% y se centrifuga 5 minutos a 6000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 50-80 μ L de TE-ARNasa. Se incuba 30 minutos a 37°C. Para eliminar el exceso de sales se transfiere a una columna sepharosa-S200 (General Electric), para recoger el ADN se centrifuga 2 minutos a 3000 rpm.

El ADN extraído (3µL) se visualiza por electroforesis en un gel de agarosa en las condiciones ya descritas.

6.9 Secuenciación de los transformantes

6.9.1 Amplificación de fragmentos a secuenciar

Para cada transformante se realiza una PCR tiempo final en un volumen final de 25 µL con 2,5 µL de buffer HiFi 10x (Thermo Scientific), 1,25 µL de dNTPs 10 mM (Promega), 2,5 µL de MgCl₂ y 0,75 µL de cada *primer*. Siendo estos FP2AN5ZF2 y Rib82seqR2 (Sección 6.2 Tabla 4) y 0,25 U de enzima HiFidelity (Thermo Scientific). Se utiliza como ADN molde 40 ng de ADN genómico del transformante. El programa utilizado consta de una etapa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 4 minutos a 72°C y una elongación final de 7 minutos a 72°C.

El secuenciado fue realizado por la empresa MacroGen Korea con los *primers* AN5Zseq-F2, ANgfpseq-R1, PhU-qF7 y PhU-qR5 (Sección 6.2 Tabla 4).

6.10 Análisis de las secuencias

Se utilizan los programas Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y Clustal: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> para el alineamiento de los productos secuenciados con el gen *phU* WT.

Se utiliza el programa Chromas Lite 2.1 para el análisis de los cromatogramas resultados de la secuenciación.

6.11 Determinación del número de copias del gen mediante PCR en tiempo real

Los ensayos de qRT-PCR se realizan utilizando 5 µL de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) en un volumen final de reacción de 10 µL conteniendo 0,5 µL de cada *primer* (6 µM), siendo estos: ANactin_qF1 y ANactin_qR1 para la actina y phU-qF7 y phU-qR5 para *phU* (Sección 6.2 Tabla 4). Se agregan 10 ng de ADN molde. Las amplificaciones se llevan a cabo en el termociclador Corbett Rotor- GeneTM 6000, utilizando un programa con una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos y luego 30 ciclos de 15 segundos a 94°C y

un minuto a 59°C. Las reacciones se realizan por duplicado. Como gen de referencia se utiliza el gen de la actina, como calibrador se utiliza la cepa AN20_tphU28 (1 copia del gen *phU*). Se realiza la PCR con el ADN de la cepa WT, de la cepa AN11_MV060 y de las cepas AN19_tphU25 y AN20_phU28 como controles (Sección 6.1). Se determina el número de copias mediante el método delta-delta Ct.

6.12 Análisis del transporte: Test de crecimiento

6.12.1 Placa maestra

Las cepas a analizar se inoculan por picadura junto con las cepas control en una misma placa de MM con los suplementos correspondientes y fuente de nitrógeno, y se incuban a 37°C durante 48 horas. Esta placa se denomina placa maestra y se utiliza como molde para las réplicas. Como controles se utilizan las cepas WT, AN11_MV060, AN19_tphU25, AN20_tphU28, AN21_tphZ3, AN25_tphZ42, AN31_MV028 y AN37_tAzgA140 (Sección 6.1). Para sembrar las muestras en la placa se debe tener en cuenta el molde del replicador.

6.12.2 Réplicas

Se preparan las placas de réplicas con MM, fuente de nitrógeno y suplementos según las auxotrofías de las cepas.

Placa control de crecimiento: NH₄ como fuente de nitrógeno y todos los suplementos (paba, pyro, ribo,)

Placas para análisis de auxotrofías: NH₄ como fuente de nitrógeno y dos suplementos, se evalúa el que no está presente en el medio.

Para analizar transporte: se sustituye la fuente de nitrógeno por hipoxantina, ácido úrico, nitrato + Oxypurinol, ó ½ amonio + 8-azaguanina.

Se esteriliza el replicador mediante alcohol y flameado y se deja enfriar. Se coloca el replicador sobre la placa maestra y luego se inocula una o dos placas con el mismo sello. Se debe volver a esterilizar antes de volver a colocar sobre la placa maestra para inocular las siguientes placas. Una vez obtenidas todas las réplicas se incuban a 37°C durante 2 días.

6.13 Localización subcelular: Microscopía de fluorescencia

Se coloca un cubreobjetos de vidrio redondo de 14 mm de diámetro por pocillo de una placa estéril de 12 pocillos. Los cubreobjetos se esterilizan previamente mediante flameado. En cada pocillo se agregan 3 mL de medio mínimo sin fosfato (MM-P) previamente suplementado con 25 mM NaH_2PO_4 , biotina (uso 1:100), 0,15 mg de ampicilina, los suplementos que correspondan y la fuente de nitrógeno elegida. Cada pocillo se inocula con 10 μL de una suspensión en Tween -4 de 10^6 esporas/mL de la cepa de interés. Se incuba a 28°C durante 14 horas. Para la observación, se retiran los cubreobjetos del pocillo y se apoyan del lado sobre el cual creció la cepa sobre un portaobjetos. Las muestras se observaron con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i, con un filtro B-2E/C Nikon para visualizar la fluorescencia emitida por la gfp. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital DS-Fil Nikon y mediante el programa NIS-Elements F3.0 y fueron tratadas con el programa Adobe Photoshop.

6.14 Almacenamiento de las cepas obtenidas

Se coloca en un criotubo 1 mL de una suspensión de conidias en Tween -4 de una placa confluyente de la cepa y 1 mL de glicerol 100% esterilizado previamente. Se hace por duplicado. Se congela con N_2 líquido y se almacena a -60°C.

7. Bibliografía

Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J., Lambrindis, G., Capaldi, S. *et al.* (2016) Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat Commun*, 7, 11336

Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2001) Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J Mol Biol*, 313, 765-774

Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C. & Diallinas, G. (2004) Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidial. *Mol microbial*, 52, 205-216

Amillis, S., Kosti, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E. & Diallinas, G. (2011) Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J Mol Biol*, 1, 1 (3), 567-580

Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. & Glatigny, A. (1999) The hxb gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol microbiol*, 31, 1065-1073

Arst, H. N., Jr. & Cove, D. J. (1973) Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 126, 111-141

Barraco-Vega, M. (2014) Caracterización de transportadores de Basidiomycotas mediante expresión heteróloga en *Aspergillus nidulans* Tesis de Maestría Facultad de Ciencias UdelaR

Barraco-Vega, M., Romero, H., Richero, M., Cerdeiras, M. P. & Cecchetto, G. (2017) Functional characterization of two novel purine transporters from the Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 601: 1-10

Caddick, M. X., Arst, H. N., Jr, Taylor, L. H., Johnson, R. I. & Brownlee, A. G. (1986) Cloning of the regulatory gene Area mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J*, 5, 1087-1090

Caddick, M. X (1992) Characterization of a major *Aspergillus* regulatory gene, areA. En U. S. Tudzynski (Ed.), Molecular Biology of Filamentous Fungi 141-152 Weinheim: VC1-I Press

Cecchetto, G. Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C. & Drevet, C. (2004) The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. J Biol Chem, 279, 3132-3141

Cecchetto, G., Richero, M., Oestreicher, N., Muro-Pastor, M., Pantano, S. & Scazzocchio, C. (2012) Mutations in the basic loop of the Zn binuclear cluster of the UaY transcriptional activator suppress mutations in the dimerisation domain. Fungal Genet Biol, 49 (9), 731-743

Cultrone, A., Dominguez, Y. R., Drevet, C., Scazzocchio, C. & Fernández-Martin, R. (2007) The tightly regulated promoter of the xanA gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron. Mol Microbiol, 63, 1577-1587

Darlington, A., Scazzocchio, C. & Pateman, J. (1965) Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. Nature, 206, 599-600

Darlington, A. & Scazzocchio, C. (1976) Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. J Bacterio, 93, 937-940

De Koning, H. & Diallinas, G. (2000) Nucleobase transporters (review). Mol Membr Biol, 17, 75-94

Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N., Cecchetto, G. & Scazzocchio, C. (1995) Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. J Biol Chem , 270, 8610-8622

Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A. & Scazzocchio, C. (1998) Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. EMBO J, 17, 3827-2827

Diallinas, G. (2007) Aspergillus transporters. En G. Goldman & S. Osmani, *Aspergilli*, Genomics, Medical Aspects, 301-320 CRC Press

Diallinas, G. & Gournas, C. (2008) The ubiquitous Nucleobase Ascorbate Transporter (NAT) family Lessons from model microbial genetic systems. Channels, 2, 363-372

- Diallinas, G. (2016) Dissection of transporter function: From genetics to structure. *Trends in Genetics*, 32 (9) 576-590
- Dupre, S., Urban-Grimal, D. & Haguenaer-Tsapis, R. (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 89–111
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996) Real Time Quantitative Pcr. *Genome Res*, 6, 986-994
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993) Kinetic Pcr Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology (NY)*, 11, 1026-1030
- Foley, K., Boguslavsky, S. & Klip, A. (2011) Endocytosis recycling, and regulated exocytosis of glucose transporters. *Biochemistry*, 50, 3048–3306
- Fromme, J. & Schekman, R. (2005) COPII-coated vesicles: Flexible enough for large cargo? *Curr Opin Cell Biol*, 17 (4), 345–352
- Glatigny, A. & Scazzocchio, C. (1995) Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 270, 3534-3550
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A. & Diallinas, G. (2010) Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol Microbiol*, 75 (1), 246-260
- Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (2011) Completing the purine utilization pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 48 (8), 840-848
- Hicke, L. & Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 141–172
- Kosti, V., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2010) Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol*, 397 (5), 1132-1143
- Kosti, V., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2012) Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. *PLoS ONE*, 7, e41939

- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A. Gioule, H., Tournaviti, S., *et al.* (2005) The Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol*, 3, 499-513
- Kryptou, E. & Diallinas, G. (2014) Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 63, 1-8
- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., & André, B. (2010) The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* , 20, 196–204
- Lewis, N., Hurt, P., Sealy-Lewis, H. & Scazzocchio, C. (1978) The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur J Biochem* , 91 (1), 311-316
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408
- MacCabe, A. P., Orejas, M. & Ramón, D. (2001) *Aspergillus nidulans* as a model organism for the study of the expression of genes encoding enzymes of relevance in the food industry. *Applied Mycology and Biotechnology*, 1, Agriculture and Food Production 239-265
- Mackay, E. M. & Pateman, J. A. (1982) The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet*, 20, 763-776
- Manfredi, J. P. & Holmes, E. W. (1984) Control of the purine nucleotide cycle in extracts of rat skeletal muscle: effects of energy state and concentrations cycle intermediates. *Arch Biochem Biophys*, 233, 515-529
- Marten, N.W., Burke, E.J., Hayden, J.M. & StrausS, D.S. (1994) Effect of Amino Acid Limitation on the Expression of 19 Genes in Rat Hepatoma Cells. *FASEB J*, 8, 538-544
- Martinez, D., Larrondo, L., Putnam, N., Gelpke, M., Huang, k., Chapman, J., *et al.* (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, 22 (6), 695-700
- Martzoukou, O. *et al.* (2015) Oligomerization of the UapA purine transporter is critical for ER-exit, plasma membrane localization and turnover *J Mol Biol*, 427, 2679-2696

- Marzluf, G. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol rev*, 61, 17-32
- Medhurst, A.D., Harrison, D.C., Read, S.J., Campbell, C.A., Robbins, M.J. & Pangalos, M.N. (2000) The Use of Taqman Rt-Pcr Assays for Semiquantitative Analysis of Gene Expression in Cns Tissues and Disease Models. *J Neurosci Methods*, 98, 9-20
- Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F. & Scazzocchio, C. (1999) The GATA factor Area is essential for chromatin remodelling in a Eukaryotic bidirectional promoter. *EMBO J*, 18, 1584-1597
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C., Osmani, A., Uki, I. L., Murray, S. *et al.* (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172 (3), 1557-1566
- Oestreicher, N. & Scazzocchio, C. (1993) Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 268, 23382-23389
- Oestreicher, N., Sealy-Lewis, H. & Scazzocchio, C. (1993) Characterisation, cloning and integrative properties of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 132, 185-192
- Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2006) The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol Membr Biol*, 337–348
- Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2007) Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 657-675
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N., Hatzinikolaou, D., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., *et al.* (2007) Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Bio*, 44 (77), 627-640
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol*, 382, 1121-1135
- Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, Vol. 19, No. 9, 2002-2007

- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* , 5, 141-238
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallynas, G., Adjadj, E., Demais, S., *et al.* (1997) Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA Factor Area. *EMBO J*, 16 , 16, 3974-3986
- Ribard, C., Rochet, M., Labedan, B., Daignan-Fornier, B., Alzari, P., Scazzocchio, C., *et al.* (2003) Sub-families of alpha/beta barrel enzymes: A new adenine deaminase family. *J Mol Biol* , 334, 1117-1131
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. & Wittwer, C.T. (1997) Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem*, 245, 154-160
- Risinger, A. & Kaiser, C. (2008) Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol Biol Cel* , *Mol Biol Cel*, 2962–2972
- Scazzocchio, C. & Darlington, A. J. (1968) The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* , 166, 557-568.
- Scazzocchio, C., Sdrin, N. & Ong, G. (1982) Positive regulation in a eukaryote study of the Uay gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles dominance and complementation studies and a fine structure map of the Uay-Oxpa Cluster. *Genetics*, 100, 185-208
- Scazzocchio, C. (1994). The purine degradation pathway genetics biochemistry and regulation. *Prog Ind Microbiol* , 29, 221-257
- Scazzocchio, C. (2000) The Fungal GATA Factors. *Curr Opin Microbio* , 3, 126-131
- Sorkin, A. & von Zastrow, M. (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*10: , 10, 609–622
- Suarez, T., De Queiroz, M. V., Oestreicher, N. & Scazzocchio, C. (1995) The sequence and binding specificity of uay, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the ppr1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* , 14, 1453-1467

- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., *et al.* (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* , 1 (6), 3111-3120
- Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C. & Rosa, A. (2000) Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* , 30 (2), 105-112
- Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., & Rosa, A. (2004) Ammoniuminduced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* , 41 (1), 42-51.
- Van den Ent, F., & Lowe, J. (2006) RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* , 67, 67-74.
- Vanden Wymelenberg A., S. G., Martinez, D., Rajangam, A., Teeri, T., Gaskell, J., Kersten, P., *et al.* (2005) The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J Biotechnol* , 118 (1), 17-34
- Vanden Wymelenberg, A., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., *et al.* (2006) Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet Biol* , 43 (5), 343-356
- Vogels, G. D. & Van der Drift, C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by Microorganisms. *Bacteriol Rev* , 40, 403-468
- Wilhelm, J. & Pingoud, A. (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBiochem*, 4, 1120-1128
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. (1997) Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques*, 22, 130-131, 134-138
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N. & Elenitoba-Johnson, K.S. (2001) Real-Time Multiplex Pcr Assays. *Methods*, 25, 430-442

Wong, K. H. Hynes, M. J. & Davis, M. A. (2008) Recent advances in nitrogen regulation: A comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot Cell*, 7, 917-925

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzhum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No. 12, e103

8. Anexo

Muestra	Actina (cb)	phU (cb)	Actina (tratado)	phU (tratado)	(Ct cb - Ct tratado)	(Ct cb - Ct tratado) Actina	R (N° copias del gen)
A120Q_1	16,15	16,26	14,74	15,03	1,23	1,41	0,9
A120Q_2	16,15	16,26	14,22	14,64	1,62	1,93	0,8
A120Q_3	16,15	16,26	15,16	15,41	0,85	0,99	0,9
A120Q_4	16,15	16,26	14,45	14,69	1,57	1,7	0,9
A120Q_5	16,15	16,26	15,45	15,68	0,58	0,7	0,9
A120Q_6	16,15	16,26	14,87	14,55	1,71	1,28	1,3
A120Q_7	16,15	16,26	15,34	15,03	1,23	0,81	1,3
P546G_1	16,15	16,26	15,33	15,51	0,75	0,82	1,0
P546G_2	16,15	16,26	14,6	15,23	1,03	1,55	0,7
P546G_3	16,15	16,26	14,92	14,8	1,46	1,23	1,2
phU25	16,15	16,26	21,95	21	4,74	-5,8	2,1
phU28	16,15	16,26	16,15	16,26	0,00	0	1,0
wt	16,15	16,26	22,53	25,28	9,02	-6,38	0,2
MV060	16,15	16,26	14,74	20,24	3,98	1,41	0,0

Tabla 6. Cálculo del número de copias del gen *phU* de cada mutante

AGRADECIMIENTOS

A Gianna por despertarme el interés por la microbiología, permitirme hacer la tesis con ella y por todo lo enseñado.

A Mariana por el tiempo, lo enseñado, las ayudas y por la paciencia.

A mis padres por el apoyo siempre.

A mi hermano por darme una mano con las imágenes.

A todos los lindos compañeros y amigos que conocí durante esta carrera.

¡GRACIAS!