

Análisis mutacional de la N279 del transportador de urea, UreA, de *Aspergillus nidulans*

MAYO, 2021

Sección Bioquímica y Biología Molecular

Tutor: Dr. Manuel Sanguinetti

Bach. Juan Idiarte Montiel



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Contenido	
Agradecimientos.....	4
Resumen	5
Abreviaturas.....	6
1 Introducción.....	7
1.1 Introducción al modelo de estudio.....	7
1.1.1 Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i>	8
1.2 Fuentes de nitrógeno utilizadas por <i>A. nidulans</i>	10
1.2.1 Urea como fuente de nitrógeno	10
1.3 Transportadores	12
1.3.1 Transportadores en <i>A. nidulans</i>	13
1.3.2 Regulación de la expresión de los transportadores de sustancias nitrogenadas en <i>Aspergillus nidulans</i>	14
1.3.3 Transporte de urea en <i>A. nidulans</i>	15
2 Objetivos	20
2.1 Objetivos generales	20
2.2 Objetivos específicos:	20
2.2.1 Generación de construcciones que porten las mutaciones N279A y N279Q por Fusion-PCR	20
2.2.2 Transformación de las construcciones generadas en una cepa que carece del gen <i>ureA</i>	21
2.2.3 Análisis de las cepas generadas.....	22
3 Resultados y discusión	25
3.1 Generación de mutantes N279A y N279Q.....	25
3.1.1 Producción de la construcción génica para llevar a cabo la generación de mutantes	25
3.1.2 Transformación de cepa MVD13A con las construcciones conteniendo las mutaciones	28
3.1.4 Secuenciación y análisis de crecimiento en placa.....	29

3.2	Determinación del número de copias de la construcción transformada por qPCR	34
3.3	Análisis de niveles de síntesis proteica a través de Western Blot	35
4	Conclusiones y perspectivas	39
5	Materiales y métodos	40
5.1	Genotipo y fenotipo de cepas empleadas	40
5.1.1	Descripción de los genotipos y fenotipos	40
5.2	Condiciones de cultivo	40
5.3	Medios de cultivo	41
5.4	Técnicas empleadas con <i>A. nidulans</i>	43
5.4.1	Transformación de <i>A. nidulans</i>	43
5.4.2	Extracción de proteínas.....	46
5.4.3	Cuantificación proteica por el método del BCA (kit marca Thermo)	47
5.4.4	Western Blot.....	48
5.4.5	Fusion-PCR.....	51
5.4.6	Análisis electroforético de ADN	53
5.4.7	Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa	53
5.4.8	Determinación del número de copias del gen mediante qPCR.....	54
5.4.9	Microscopía de fluorescencia.....	54
5.4.10	Extracción de ADN genómico	54
5.4.11	Secuenciado de mutantes	55
6	Anexo	57
6.1	Construcción de 5'UTR_ureA::ureAN279A/N279Q::gfp::pyrGAF::3'UTR_ureA	57
7	Bibliografía.....	60

Agradecimientos

A la sección de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, en especial al laboratorio 313, por recibirme de brazos abiertos, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación, por recibirme como un miembro más del laboratorio y siempre hacerme sentir parte de un equipo.

A mi tutor de tesis Manuel, que desde el día 1 siempre estuvo dispuesto a dar una mano con absolutamente todo 24 horas del día, 365 días del año, desde lo académico hasta lo personal. Por enseñarme no solo a manejarme en un laboratorio sino que también a ser un investigador responsable, crítico y sobre todo entusiasta. No hubo un solo día en el que no quisiera ir a darme una vuelta por el laboratorio 313, y Manuel es gran parte del por qué.

A Ana, que siempre estuvo en la vuelta y siempre estuvo dispuesta a ayudarme en lo que precisara, desde la mesada hasta lo teórico.

A Juan José, por ser mi guía académico en un momento donde no sabía cómo dirigir la carrera, por brindar una luz y por introducirme a este laboratorio.

A mi familia, que estuvo siempre presente en todo este trayecto desde lejos pero siempre brindando una mano. En especial a mi madre, mi hermana y mi abuela, rocas fundamentales en mi vida. De una manera u otra siempre se hacían presentes, les dedico un pedacito de este título a cada una de ellas.

A mis amigos, por siempre estar en las buenas y en las malas. Por ser compañeros de estudio, de biblioteca, de vida. Por siempre haberme apoyado en mis fracasos universitarios y por volverme a levantar cuando lo necesité.

A Valentina, más que una amiga una hermana. Por haber sido mi única variable constante en toda la carrera. Por siempre haber estado al lado mío, en los aciertos y en los errores. Por motivarme a darlo todo en los exámenes, por las risas en la biblioteca. Por ser mi editora de tesis, compañera de estudio, hombro en el cual llorar. Por entender mis frustraciones, enojos, alegrías, y sorpresas. Que sepas que si llegué hasta acá fue por ti.

A Amparo, por ser mi compañera infalible en el laboratorio y hacer que nuestro día a día sea un poco mas ligero. Por siempre extender la mano para ofrecer ayuda y por siempre estar.

A Maria Elena, por ser una gran profesora y por dar su granito de arena para ayudarme a embarcar en esta nueva etapa.

Resumen

La urea es una fuente de nitrógeno ampliamente disponible producto del metabolismo de compuestos nitrogenados de animales, plantas y hongos. *Aspergillus nidulans* puede utilizarla como fuente de nitrógeno, obteniéndola por su propio metabolismo mediante la vía de la degradación de las purinas o incorporándola desde el medio hacia el interior celular. Esta incorporación está mediada por dos procesos: a través de un fenómeno de difusión facilitada o pasiva cuando existen concentraciones extracelulares altas de urea o mediante un transporte activo mediado por una permeasa específica denominada UreA (codificada por el gen *ureA*) cuando la concentración extracelular de la urea es baja. La transcripción de *ureA* es reprimida en presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno, como pueden ser el amonio o la L-glutamina en el medio de cultivo y puede ser activada por el factor AreA en la ausencia de estas fuentes.

En lo que respecta al estudio de la funcionalidad del transportador, mediante un modelado estructural combinado con un análisis por mutagénesis dirigida de aminoácidos conservados entre UreA y sus ortólogos en hongos y plantas, se pudo identificar que los residuos W82, Y106, A110, T133, N275, D286, Y388, Y437 y S446 estarían implicados en la unión, reconocimiento y/o translocación de la urea. Un análisis exhaustivo del modelo estructural de UreA permitió identificar un par de residuos aminoacídicos conservados (W82 y W84) en todos los transportadores de urea de hongos y plantas caracterizados hasta el momento que podrían formar parte del sitio de interacción o unión al sustrato. Estos aminoácidos se encuentran generando una especie de “ranura” en donde podría interaccionar la molécula de urea. Según el modelo estructural de UreA, la N279 se encuentra próxima a los W mencionados y posee propiedades fisicoquímicas que la hacen capaz de interaccionar con la urea. Al igual que los W82 y W84, la N279 se encuentra conservada en los transportadores de urea de función establecida y además se encuentra expuesta al solvente.

Con la finalidad de determinar un posible rol funcional, en este trabajo se realizó un análisis mutacional de la N279. Para el mismo, se procedió a mutar la N279 por la alanina (aminoácido no polar) y la glutamina (aminoácido polar) mediante el uso de la “Fusion-PCR”. Los mutantes generados permitieron determinar que la N279 tendría un rol en lo que respecta a la afinidad por el sustrato mediante el análisis de crecimiento en placa y que dichas mutaciones no tendrían efecto en la síntesis proteica o transporte del transportador hacia la membrana plasmática, confirmado mediante ensayos de Western Blot y microscopía de fluorescencia respectivamente.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTPs	2-Deoxinucleótidos 5´trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
Kb	Kilobases
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
TE	Buffer Tris EDTA
UV	Ultravioleta

1 Introducción

El reino Fungi comprende un amplio espectro de organismos eucariotas unicelulares y pluricelulares (aproximadamente 1.5 millones de especies) donde se diferencian de otros reinos debido a la presencia de quitina en sus paredes celulares. Dentro de éstos, podemos encontrar a las setas, levaduras y mohos. Estos últimos 2 pertenecen al phylum Ascomycota, que comprende hongos que existen en ambientes terrestres y acuáticos, sustratos como la madera y desechos orgánicos, componiendo al grupo taxonómico más grande dentro del filo con 32000 especies descritas en 3400 géneros (Kirk, P et al., 2001). Aquí podemos encontrar a organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, ampliamente utilizados en la industria y la investigación. Como característica distintiva de este phylum, los Ascomycota presentan unas estructuras en forma de saco, los ascos, los cuales contienen un número definido de ascosporas producto de la reproducción sexual. Pueden ser miceliales o unicelulares, y no presentan células flageladas. Los primeros, poseen un micelio septado con poro central simple, los cuales pueden estar taponados por los corpúsculos de Woronin; por estos poros es posible el pasaje de organelos y núcleos. La mayoría de las especies presentan cuerpos fructíferos, los ascocarpos, donde se encuentran los ascos producto de la reproducción sexual. Suelen presentar dos fases reproductivas distinguibles y no solapadas, siendo éstas la sexual y la asexual, dándose esta última generalmente por conidias, esporas formadas en los conidióforos siendo éstas hifas reproductivas especializadas.

1.1 Introducción al modelo de estudio

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso cosmopolita perteneciente al género *Aspergillus* dentro del phylum ya mencionado, el cual es frecuentemente utilizado como modelo de estudio eucariota hace más de 50 años en temas como puede ser control del ciclo celular, patogénesis o estudios genéticos. Esto es resultado de:

- Su genoma secuenciado (Galagan *et al.*, 2005) y fácilmente disponible
- Requerimientos nutricionales mínimos y simples, como puede ser una fuente de carbono orgánico, nitrato como fuente de nitrógeno y sales inorgánicas.
- Posee un crecimiento rápido, formando colonias compactas en agar. Aproximadamente 48 horas luego del plaqueo ya se pueden clasificar las colonias por morfología, color de conidias, etc, permitiendo una sencilla observación de fenotipos.

-
- Sus conidias son producidas en grupos de cadenas paralelas, con cada conidio derivando un solo núcleo. Esto permite el estudio de problemas que requieren precisa estimación de los linajes celulares y nucleares.
 - Es una plataforma confiable para realizar transformaciones (Ballance *et al.*, 1983) permitiendo así el clonado de genes, sobreexpresión génica, entre otros.

Sumado a la facilidad de manipulación de este hongo, mediante simples ensayos de crecimiento en placas de Petri se pueden detectar además del crecimiento normal (salvaje) o la falta total de crecimiento, fenotipos intermedios característicos como por ejemplo de mutantes con defectos de transporte de un determinado metabolito o que pueden incorporarlo a través de sistemas secundarios de transporte. Así, es posible seleccionar fácilmente cepas que porten mutaciones espontáneas o inducidas por mutágenos químicos o luz UV que afecten la cinética, la afinidad (cepas deficientes en el transporte a baja concentración de sustrato y por tanto incapaces de crecer en estas condiciones, mientras que a mayores concentraciones crecen normalmente) o especificidad (cepas que crecen en un sustrato determinado pero no en otro) de un transportador dado. Por otra parte, se pueden mutar específicamente residuos conservados o semiconservados entre proteínas homólogas, cambiándolos por aminoácidos con propiedades fisicoquímicas particulares (carga, hidrofobicidad, aromaticidad, etc.). Finalmente, el aislamiento de revertantes (supresores intragénicos) que reestablezcan o alteren la actividad de los transportadores en los mutantes aislados es una herramienta valiosa para identificar interacciones entre diferentes regiones de la proteína.

1.1.1 Ciclo de vida de *A. nidulans*

A. nidulans presenta un ciclo de vida con una alternancia de generaciones (Figura 1). Sin embargo, a la hora de llevar a cabo este trabajo, se manipuló el estado haploide del organismo. Como fue previamente mencionado, la conidiogénesis en este organismo genera conidias que provienen de un solo linaje tanto celular como nuclear, lo cual nos permite estimaciones genotípicas precisas. En condiciones normales, la fase diploide es transitoria, resultado de la reproducción sexual presente con el fin de generar una nueva generación con variabilidad genética entre organismos compatibles (Pontecorvo *et al.*, 1953).

1.1.1.1 Reproducción asexual

Cuando una ascospora germina, ésta comienza a crecer y poco después el micelio comienza a reproducirse asexualmente para formar los conidióforos, los cuales son

generalmente multinucleados. Estos conidióforos son formados a partir de hifas septadas multinucleadas, las cuales se diferencian para formarlos. El conidióforo culmina su crecimiento generando una vesícula. Desde la superficie de ésta, se desarrollan de manera sincronizada un número de esterigmas uninucleados primarios organizados en filas, seguida por una fila de fiálides o esterigmas secundarios. Son éstas las que darán lugar a una larga cadena de conidias, denominándose células conidiogénicas. Al recibir cada esterigma primario un solo núcleo, todas las conidias producidas desde una fiálide serán genéticamente idénticas, y está aquí la importancia de la reproducción asexual a la hora de abordar los estudios moleculares, como se mencionó previamente. A diferencia de lo que puede ocurrir en otras especies, los ascomicetes producen sus esporas asexuales como conidias externamente. Muchas generaciones de conidias son producidas durante el crecimiento, y son éstas las responsables de la propagación y diseminación del hongo (Adams *et al.*, 1998)

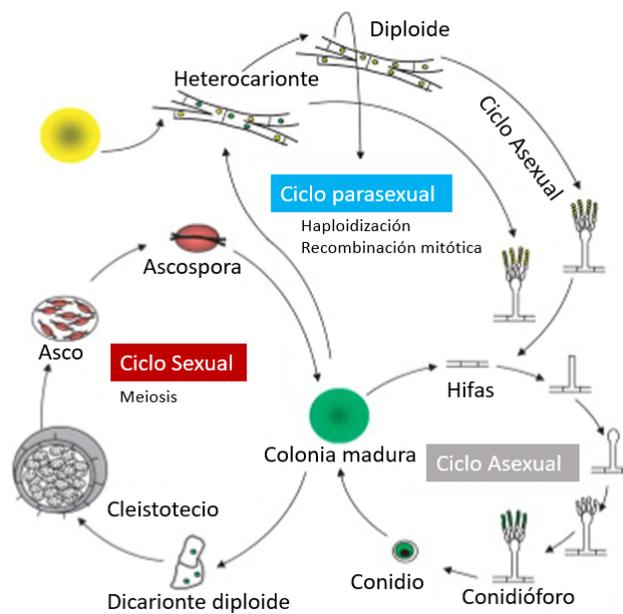


Figura 1: Ciclo de vida de *A. nidulans*. Tomado y adaptado de Scazzocchio, 2019

1.1.1.2 Reproducción sexual

La reproducción sexual se concentra en órganos especializados (o cuerpos fructíferos) denominados cleistotecios, los cuales se conforman por estructuras en forma de saco denominados ascos, característicos del phylum, donde se formarán las ascosporas producto de la meiosis. La reproducción sexual ocurre en el mismo micelio que produce las conidias. Para esto, se tiene que dar la formación de gametangios multinucleares denominados anteridios y ascogonios, siendo los primeros los gametangios masculinos y los segundos los gametangios femeninos. La plasmogamia - o la fusión de protoplasma -

se da una vez que el núcleo masculino migra hacia el ascogonio mediante el tricógino. Las hifas se comenzarán a desarrollar, y se producirán divisiones celulares de manera tal que las células resultantes sean dicarióticas, es decir, $n+n$. Los ascos se forman cerca de los extremos de las hifas dicarióticas. Luego de divisiones subsecuentes, dos núcleos se fusionan (cariogamia) para formar un núcleo diploide, es decir, $2n$, el cual será el cigoto. Cabe destacar, que este cigoto es el único núcleo diploide en el ciclo de vida de un ascomicete. Este núcleo diploide sufrirá meiosis, la cual generalmente es seguida por una división mitótica, produciendo un asco con 8 núcleos haploides. Estos se segmentan en el citoplasma formando las ascosporas, las cuales se liberarán completando así este ciclo (Pontecorvo *et al.*, 1953).

1.1.1.3 Reproducción parasexual

Los núcleos en los heterocariontes pueden (raramente) fusionarse, resultando en diploides estables lo cual establece el ciclo parasexual. Este es un fenómeno genético caracterizado por la pérdida gradual de cromosomas posterior a la plasmogamia y cariogamia los cuales ocurren en secuencia, es decir, los diploides pueden revertirse a haploides (Scazzocchio, 2019).

El uso del ciclo parasexual permite, por ejemplo, la cartografía por recombinación mitótica, la determinación de grupos de complementación y del carácter de dominancia o recesividad de las mutaciones (Pontecorvo *et al.*, 1958; Forbes *et al.*, 1965).

1.2 Fuentes de nitrógeno utilizadas por *A. nidulans*

A. nidulans, al ser un microorganismo saprófita, puede utilizar una amplia variedad de fuentes de nitrógeno como puede ser amonio, nitrato, aminoácidos como la glutamina, o sustratos complejos como pueden ser el colágeno o la elastina. El amonio y la glutamina son fuentes de nitrógeno energéticamente favorecidas y por lo tanto preferenciales, mientras que otras fuentes, como el nitrato, purinas, aminoácidos o metabolitos como la urea son ejemplos de fuentes de nitrógeno secundarias (Fu & Marzluf, 1997; Wong *et al.*, 2008).

1.2.1 Urea como fuente de nitrógeno

La urea (Figura 2) puede ser utilizada como fuente de nitrógeno por bacterias, hongos y plantas producto del metabolismo de componentes nitrogenados de diferentes animales, plantas y microbios (revisado en McDonald *et al.*, 2006). *A. nidulans* genera urea como un producto de la vía de la degradación de las purinas (Figura 3), y la puede

utilizar como la única fuente de nitrógeno pero no como una fuente de carbono (Hynes & Pateman, 1970)

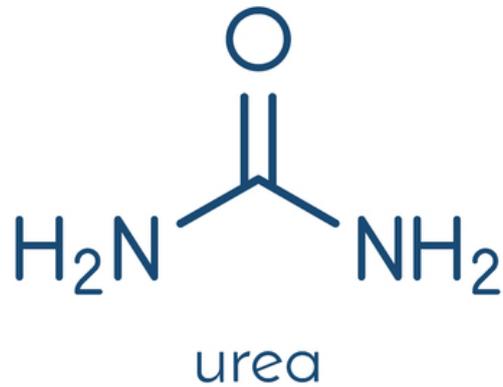


Figura 2: Representación de la molécula de urea

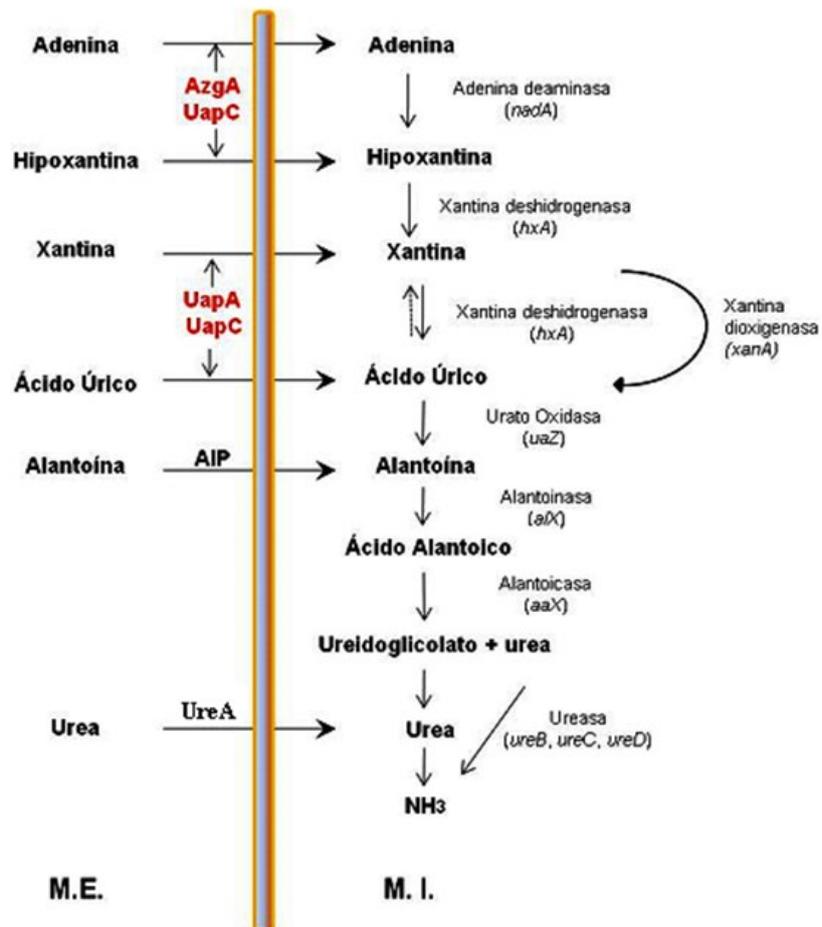


Figura 3: Vía de degradación de las purinas de *A. nidulans*. Modificado de Gorfinkiel (1994). La urea entra a través de la permeasa UreA. A la derecha se señalan las enzimas que metabolizan cada compuesto y entre paréntesis el nombre de los genes que las codifican. M.E.: medio extracelular; M.I.: medio intracelular (tomado de: (Harispe, 2008)).

En algunas especies de algas y hongos, la urea es degradada por una actividad ATP dependiente sensible a la avidina (Roon & Levenberg, 1968). En *A. nidulans* sin embargo, la ureasa es la enzima que interviene en la vía de la degradación de las purinas. Existen 3 loci, *ureB*, *ureC* y *ureD* que tendrían un rol en la actividad de la ureasa, como podría ser en la incorporación de cofactores esenciales para la actividad de la ureasa (Mackay & Pateman, 1980).

1.3 Transportadores

El movimiento transmembrana de solutos a través de la membrana lipídica está mediado por proteínas de transporte o transportadores. Existen dos clases de proteínas transportadoras: los canales, los cuales forman poros angostos permitiendo el movimiento pasivo de agua y pequeños iones inorgánicos a través de la membrana y los transportadores, los cuales sufren cambios conformacionales secuenciales para transportar pequeñas moléculas específicas a través de las membranas. Estos últimos pueden estar acoplados a una fuente de energía para catalizar el transporte activo, el cual a su vez genera diferencias en la composición del citosol comparado con aquella del exterior extracelular o el fluido entre los organelos.

Por un lado, los sistemas de transporte activo primario utilizan la energía libre de la hidrólisis del ATP para transportar un soluto en contra de su gradiente de concentración, como sucede con las bombas ATP-dependientes. Por otro lado, tenemos a los sistemas de transporte activo secundario, los cuales utilizan un movimiento de iones para el transporte activo de una molécula (Figura 4)(Alberts *et al.*, 2008).

Los transportadores secundarios acoplan la energía libre del potencial electroquímico de un soluto al movimiento transmembrana de otro. El transportador expone los sitios de unión al sustrato hacia un lado de la membrana o al otro durante la catálisis de transporte, requiriendo un cambio conformacional sustancial en la proteína. El mecanismo de los transportadores secundarios involucra un acoplamiento mecánico de flujo de sustrato al potencial electroquímico de solutos o iones co-sustrato. Este proceso se denomina secundario debido a que la fuente de la energía- el gradiente electroquímico- debe primero ser generado por mecanismos ATP dependientes, los cuales a su vez son conocidos como transporte primario. (Forrest *et al.*, 2011).

Algunos transportadores median el movimiento de un soluto de un lado de la membrana a otro de una manera pasiva, estos se llaman facilitadores. Otros funcionan como transportadores acoplados, en los cuales la transferencia de un soluto estrictamente depende en el transporte de un segundo soluto. El transporte acoplado involucra o el

los transportadores de amonio, glucosa, purinas, aminoácidos, fructosa, nitrato, sulfato y galactosas, así como la H⁺/ATPasa de la membrana plasmática (Diallinas, 2008).

1.3.2 Regulación de la expresión de los transportadores de sustancias nitrogenadas en *Aspergillus nidulans*

Como se mencionó anteriormente, los hongos filamentosos son capaces de usar muchos compuestos como fuentes de nitrógeno, pero preferencialmente utilizan fuentes que son energéticamente favorables como el amonio o la glutamina mientras estén presentes en el medio. En la ausencia de estas fuentes, las fuentes de nitrógeno no preferenciales como el nitrato, urea, ácido úrico, aminos, amidas, purinas, y pirimidinas también pueden ser utilizadas (Marzluf, 1997; Wong *et al.*, 2008). El mecanismo regulatorio que permite la utilización de una fuente preferencial en una circunstancia y una fuente de nitrógeno secundaria en otra, se denomina represión metabólica por nitrógeno. Este circuito regulatorio global asegura la activación transcripcional de los genes estructurales que codifican las enzimas y permeasas requeridas para el uso y la degradación de fuentes de nitrógeno no preferenciales en ausencia de fuentes preferenciales (Wiame *et al.*, 1985; Marzluf, 1997; Fraser *et al.*, 2001; Magasanik & Kaiser, 2002). En *A. nidulans*, todas las enzimas y permeasas cuya síntesis está sujeta a la represión metabólica por nitrógeno están bajo el control de un gen de regulación positiva denominado *areA* (Arst & Cove, 1973; Hynes, 1975).

AreA es un factor GATA, el cual actúa como un activador de la transcripción. Éste es inhibido en la presencia de amonio o de L-glutamina en un medio de cultivo (Kudla *et al.*, 1990). En *A. nidulans*, el gen regulador *areA* fue clonado hace más de 25 años (Fu & Marzluf, 1987; Caddick, 1992), y es el sistema de regulación de nitrógeno mejor caracterizado. La actividad de AreA está regulada por varios procesos de señalización que reportan la disponibilidad extracelular de nitrógeno y el estado intracelular del mismo (Caddick *et al.*, 2006). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, la actividad de AreA es parcialmente desreprimida debido a niveles incrementados de la transcripción de *areA* y la estabilidad del ARNm de *areA* comparado con condiciones de nitrógeno suficientes (Langdon *et al.*, 1995; Platt *et al.*, 1996; Morozov *et al.*, 2000, 2001). A su vez, la actividad de AreA está controlada por una translocación al núcleo inducida por la falta de nitrógeno y una subsecuente elevada expresión de genes dependientes de AreA en *A. nidulans* (Todd *et al.*, 2005; Michielse *et al.*, 2014). Además de la translocación al núcleo, la exportación desde el núcleo también parecería ser un mecanismo para la regulación de

la actividad de AreA; luego de añadir una fuente preferencial de nitrógeno, AreA es exportada desde el núcleo y ya no puede activar la expresión de sus genes blanco.

1.3.3 Transporte de urea en *A. nidulans*

Debido a que la urea es una molécula altamente polar, necesita de sistemas de transporte celular especializados para atravesar la membrana. El estudio del transporte de urea en *A. nidulans* fue abordado por Pateman y colaboradores (1982). Estos investigadores determinaron que este transporte tiene lugar a través de dos sistemas de captación diferentes: uno pasivo, de baja afinidad, que actúa cuando la concentración extracelular de urea es mayor a 3 mM; y otro activo, de alta afinidad, que actúa cuando la concentración de urea es menor a 3 mM. *A. nidulans* también puede incorporar la tiourea, un análogo tóxico de la urea (Figuras 5 y 6) a través de los mismos sistemas de transporte. También se determinó que el sistema de transporte de urea no es inducido por la urea pero está sujeto a la regulación metabólica por nitrógeno (Pateman *et al.*, 1982): cuando las células crecen en presencia de amonio o glutamina, se observa un nivel bajo de transporte de urea, y al pasar a un medio libre de nitrógeno, esto resulta en un incremento en la habilidad de transportar urea. Este incremento en la habilidad de transporte de urea es interpretada como de-represión de nitrógeno (Pateman *et al.*, 1973).

La caracterización del transportador específico de alta afinidad por la urea fue realizada en el laboratorio en donde se llevó a cabo esta tesis (Abreu *et al.*, 2010). UreA (codificado por el gen *ureA*) ha sido identificado como el único transporte de urea de alta afinidad en el organismo. UreA es una proteína de 693 aminoácidos, para la que se predicen 15 dominios transmembrana y que pertenece a la Superfamilia de Simportadores de Sodio (Abreu *et al.*, 2010). Éste constituye una subfamilia de simportadores H⁺, dentro de la superfamilia de simportadores sodio:soluto (SSS), junto a los transportadores de urea de hongos y plantas caracterizados hasta el momento: Dur3 de *Saccharomyces cerevisiae* (ElBerry *et al.*, 1993), PiDur3 de *Paxillus involutus* (Morel *et al.*, 2008), CaDur3 de *Candida albicans* (Navarathna *et al.*, 2011), AtDur3 de *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2003; Merigout *et al.*, 2008), OsDur3 de *Oryza sativa* (Wang *et al.*, 2012) y ZmDur3 de *Zea mays* (Zanin *et al.*, 2014). Éstos comparten una identidad de secuencia de 35-74% y la mayoría de ellos incluyen 14-15 segmentos alfa hélice transmembrana predecidos (TMS). Cabe destacar que estas permeasas específicas de urea en hongos y plantas son estructural y mecanísticamente diferentes de aquellas encontradas en sistemas de transporte animales o bacterianos (ElBerry *et al.*, 1993).

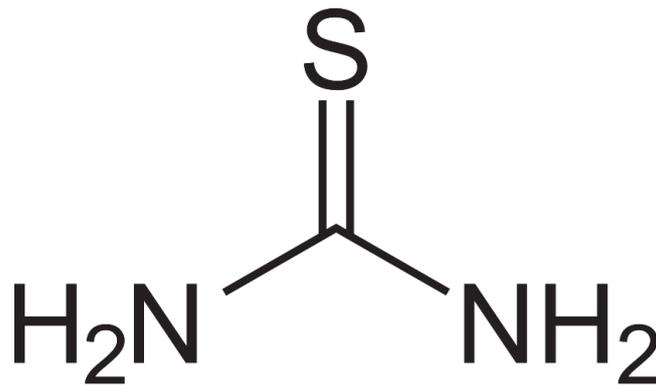


Figura 5: Representación de la molécula de tiourea

En lo que respecta a la regulación transcripcional de *ureA*, a partir de análisis de mutantes para el gen *areA* y ensayos de *Northern Blot* de los ARN mensajeros de *ureA* bajo distintas condiciones como pueden ser distintos tiempos de incubación a 37°C, condiciones de represión/no represión, durante diferentes etapas de germinación, en cepas mutantes/salvajes y bajo distintas fuentes de nitrógeno, se pudo determinar que:

- La transcripción de *ureA* es dependiente de *AreA*, y es fuertemente reprimida por amonio y no inducible por urea.
- El nivel de transcripción máximo se da incubando a 37°C cuando se utiliza a la urea como fuente de nitrógeno.
- Cuando se realiza un cultivo bajo una fuente no represora de nitrógeno, el nivel de transcripción de *ureA* aumenta considerablemente en las primeras 2 horas de germinación de las esporas, para que luego sus niveles decaigan.
- La activación transcripcional de *ureA* durante la germinación conidial es dependiente de *AreA* y responde a la represión metabólica por nitrógeno.

Por otra parte, *UreA* está sujeta a una regulación post-traducciona. Mediante el uso de una fusión de *UreA* a la proteína verde fluorescente (GFP) se observó que *UreA* se localiza a nivel de la membrana plasmática en presencia de una fuente de nitrógeno no represora (como puede ser la prolina). Sin embargo, cuando se agrega amonio al medio de cultivo, *UreA* es internalizada por endocitosis y degradada en vacuolas (Abreu *et al.*, 2010), regulación que a su vez ha sido observada para otros transportadores (Gournas *et al.*, 2009; Apostolaki *et al.*, 2009).

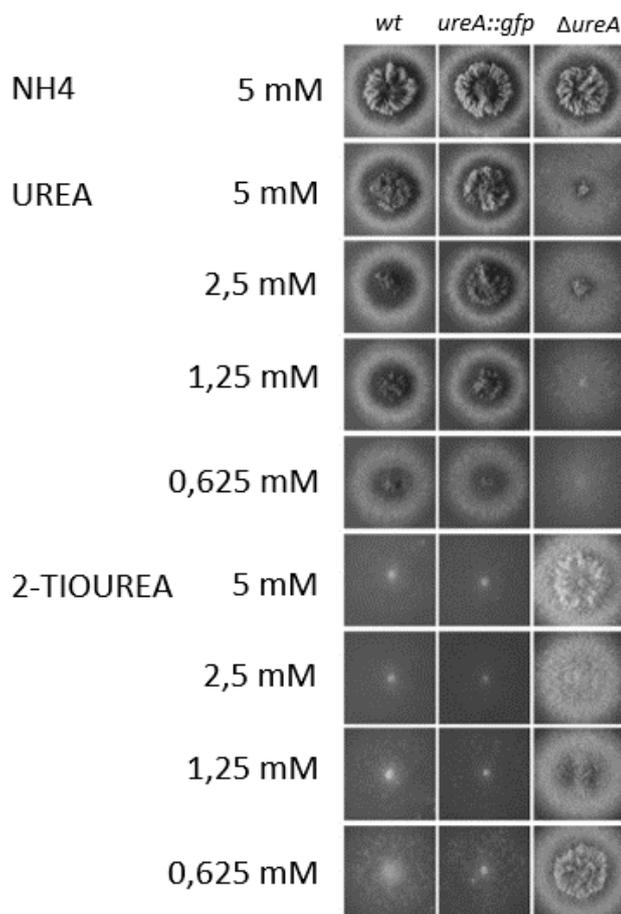


Figura 6: Análisis de crecimiento en placa (37°C, 48 hs) de *A. nidulans* en medio con amonio, urea o 2-tiourea (en este caso se utilizó 10 mM nitrato de sodio como fuente de nitrógeno). Wt: cepa salvaje para el gen *ureA*. *ureA::gfp*: cepa que contiene el gen de *ureA* fusionado al gen que codifica para la proteína GFP. Δ ureA: cepa con gen *ureA* deletado Tomado y adaptado de Abreu et al., 2010.

En lo que respecta al estudio de la funcionalidad del transportador, mediante un análisis por mutagénesis dirigida de aminoácidos conservados entre UreA y sus ortólogos en hongos y plantas, se pudo identificar que los residuos W82, Y106, A110, T133, N275, D286, Y388, Y437 y S446 estarían implicados en la unión, reconocimiento y/o translocación de la urea. De estos, los residuos W82, Y106, A110, N275, D286, Y437 y S446 se ubican en hélices transmembrana (TMS) que coinciden con aquellas que en vSGLT (co-transportador de Na⁺/galactosa de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, cuya estructura fue determinada por cristalización (Faham et al., 2008; Watanabe et al., 2010), sobre el cual se realizó un modelado estructural de UreA) se identificaron como parte de los sitios de unión y reconocimiento del sustrato (Sanguinetti et al., 2014). Un análisis más exhaustivo del modelo estructural de UreA permitió identificar un par de residuos aminoacídicos conservados en todos los transportadores de urea de hongos y plantas caracterizados hasta el momento (y no conservados en transportadores de otros sustratos, de función establecida, pertenecientes a la SSS) (Figura 7), que podrían formar parte del sitio de interacción o unión al sustrato. Estos aminoácidos, W82 y W84, están localizados en el TMS 2. Éste tiene la particularidad de ser discontinuo, es decir, está

compuesto por 2 mitades de hélice transmembrana que se unen a través de una región “desenrollada”. En esta última se localizan estos aminoácidos. Cabe mencionar que para diversos transportadores las regiones desenrolladas presentes en TMS discontinuos tienen un rol indispensable en el transporte de sustrato (Vangelatos *et al.*, 2009; Shi 2013; Drew *et al.*, 2016). W82 y W84 se encuentran enfrentados en esta región, generando una especie de “ranura” en donde podría interaccionar la molécula de urea. Según el modelo estructural de UreA, la N279 (TMS 7), se encuentra próxima a los W mencionados y posee propiedades fisicoquímicas que la hacen capaz de interaccionar con la urea (Figura 8). Al igual que el W82 y W84, la N279 se encuentra conservada en los transportadores de urea de función establecida y además se encuentra expuesta al solvente.



Figura 7: Alineamiento múltiple de secuencias de transportadores de urea de hongos y plantas, y de transportadores, que también pertenecen a la SSS pero que transportan otros sustratos. Las secuencias alineadas incluyen UreA de *A. nidulans*, ortólogos caracterizados en hongos y plantas- ScDur3 de *S. cerevisiae*, AtDur3 de *A. thaliana*, PiDur3 de *P. involutus*, CaDur3 de *C. albicans*, OsDUR3 de *C. albicans*, ZmDUR3 de *Z. mays*, PutP de *E. coli* (transportador de sodio/prolina), vSGLT de *V. parahaemolyticus*, hSGLT de *Homo sapiens* (transportador de sodio/glucosa) y NIS (transportador de sodio/yoduro). Se utilizó el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011) con la herramienta de alineamiento MUSCLE (Edgar, 2004)

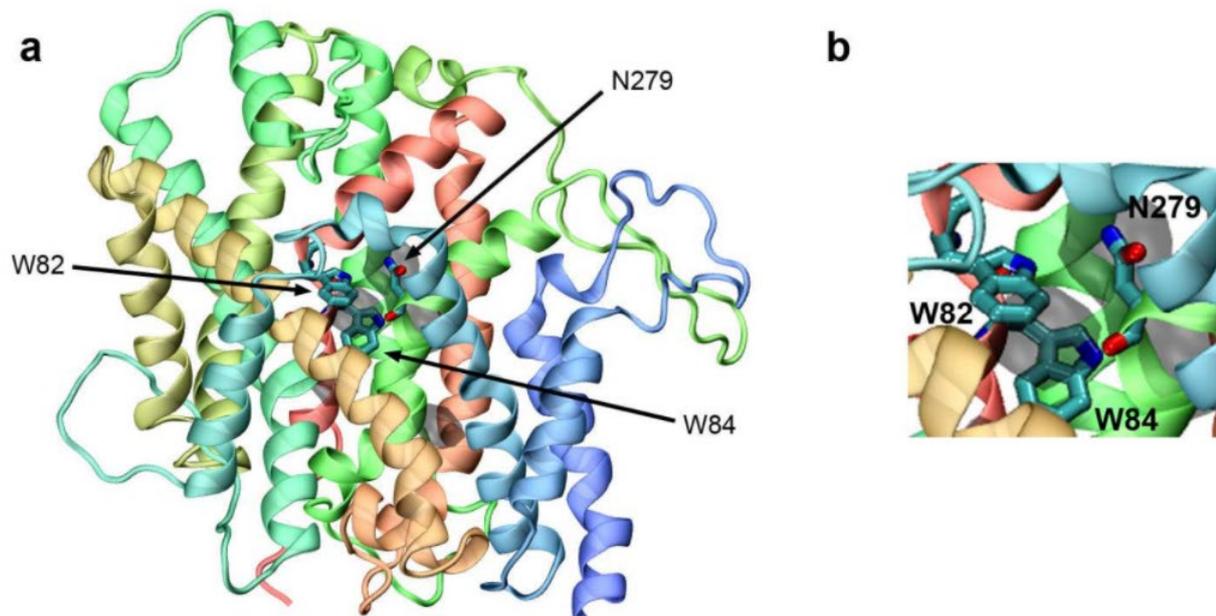


Figura 8: Modelado de UreA en base a la estructura reportada para vSGLT (Protein Data Bank ID: 3DH4). a) Vista del transportador desde el medio extracelular. Se indican los aminoácidos W82, W84 y N279 mencionados en el texto. Las regiones semitransparentes en gris muestran posibles sitios de unión de moléculas de urea identificados por el software FTmap (<http://ftmap.bu.edu/>). b) Vista ampliada de lo observado en a). Imagen realizada por el Dr. Sergio Pantano (Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, Institut Pasteur de Montevideo).

2 Objetivos

2.1 Objetivos generales

Contribuir al conocimiento acerca de la relación estructura/función de transportadores activos de urea de hongos y plantas, mediante el análisis mutacional de la N279 localizada en el posible sitio de unión a la urea.

2.2 Objetivos específicos:

Para el análisis de la N279 (aminoácido polar) se planteó una estrategia la cual consiste en mutarla, en primer lugar, por Alanina, el cual es un aminoácido apolar, y en segundo lugar por la Glutamina, el cual es un aminoácido con propiedades fisicoquímicas similares a la Asparagina. A continuación, se describen los objetivos específicos para llevar a cabo el análisis.

2.2.1 Generación de construcciones que porten las mutaciones N279A y N279Q por Fusion-PCR

Para generar dichas mutaciones, se optó por utilizar la técnica de “Fusion PCR” (Szewczyk *et al.*, 2007). Esta técnica permite la generación de fragmentos lineales de ADN que pueden ser utilizados para transformación sin tener que utilizar los procedimientos de clonado convencionales. Este enfoque es muy rápido comparado con métodos de clonado convencionales y es versátil. Las moléculas creadas por este enfoque pueden ser utilizadas para reemplazar genes, reemplazar promotores o añadir proteínas marcadoras (por ejemplo GFP).

Esta técnica consta de 2 etapas (Figura 9):

- Primera ronda de PCR: se generan dos fragmentos génicos, uno comprendiendo el 5' del gen *ureA* hasta el lugar de la mutación deseada en el gen, y el otro desde este lugar hasta el 3' UTR del gen. El incluir 1 kb de las regiones UTR de *ureA* se hace con el fin de dirigir la construcción hacia el locus *ureA* y que ésta se integre por doble recombinación. Para esto, se realizan dos reacciones de amplificación por PCR (una para cada fragmento) y por ende se diseñaron dos pares de *primers*. Un par servirá para amplificar la región 5' al sitio de la mutación y otro para la región 3' al sitio de la mutación. Nótese, que un *primer* del par hibridará en un extremo del gen (por ejemplo, el extremo 5' UTR) y el otro deberá estar diseñado de forma tal que porte la mutación deseada en su secuencia (ver Figura 8). De esta manera, se introdujo la mutación deseada durante la PCR. De la misma manera, se

repitió la amplificación de la región flanqueante 3' con su respectivo par de *primers*.

- **Segunda ronda de PCR:** En esta ronda, los fragmentos generados en la primera ronda actuaron como molde entre ellos, y de esta manera se logró generar una construcción génica única conteniendo la mutación deseada. En esta instancia la región que porta la mutación deseada (introducida por los *primers*) va a servir como cebador para la fusión. Además, se hizo uso de los *primers* “*nested*”: la elección de usar *primers* “*nested*” en oposición a los *primers* originales se basa en que estos *primers* incrementan en gran escala la especificidad de la amplificación, reduciendo la chance de obtener bandas adicionales a la construcción deseada.

La construcción resultante tiene al gen *ureA* fusionado al gen que codifica para la *gfp* y porta el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* (ver Materiales y Métodos). Cabe destacar que esta fusión no afecta la funcionalidad de la proteína (Abreu *et al.*, 2010).

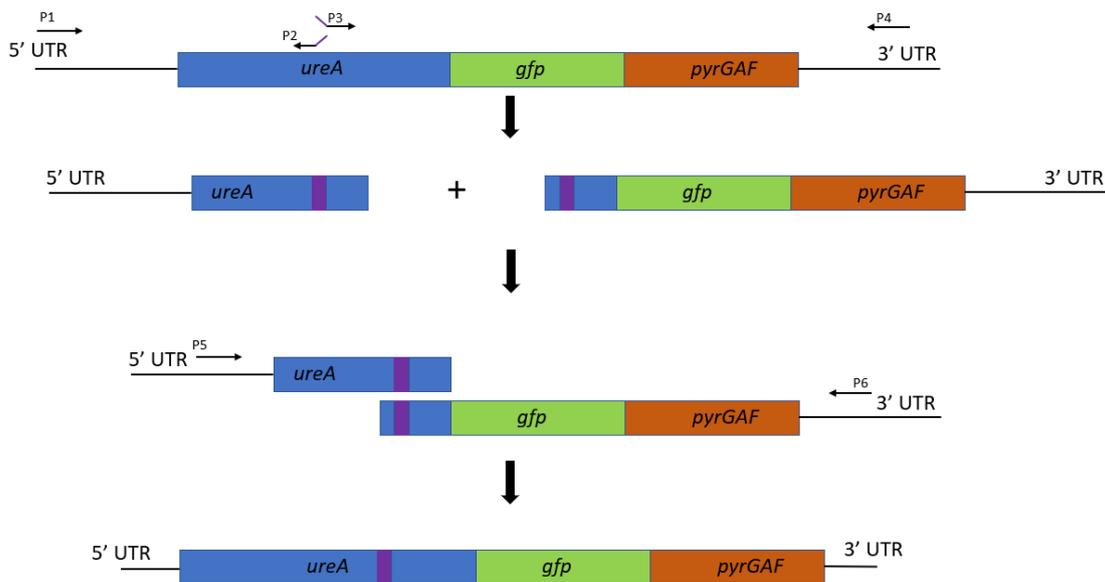


Figura 9: Diagrama esquemático del uso de la Fusión PCR. P1 y P2 representan los primers para amplificar el fragmento 5' mientras que P3 y P4 los primers para amplificar el fragmento 3'. Nótese que P2 y P3 portan una “cola” violeta representativa de la mutación, la cual se marca con el mismo color en el esquema de la construcción. Por otro lado, P5 y P6 representan los primers *nested*.

2.2.2 Transformación de las construcciones generadas en una cepa que carece del gen *ureA*

Una vez obtenida la construcción génica se procedió a la transformación de una cepa receptora que carece de la secuencia codificante de *ureA* ($\Delta ureA$), ya que esta fue sustituida por un marcador de selección (ver Materiales y Métodos). Al hacer uso de

regiones flanqueantes homólogas con la secuencia génica original, se pudo transformar utilizando la recombinación homóloga propia del organismo (Figura 10). Para aumentar la probabilidad de integración de la construcción al locus deseado (y no en otra región del genoma), se transforman cepas que sean deficientes en el gen *nkuA* ($\Delta nkuA$) ya que este gen está involucrado en la recombinación no homóloga. Es importante destacar que la carencia de este gen no causa inhibición de crecimiento o sensibilidad a ningún mutágeno, pero reduce ampliamente la frecuencia de integración heteróloga del ADN transformante durante la transformación. En las cepas $\Delta nkuA$, aproximadamente 90% de los transformantes llevan una integración homóloga única (Nayak *et al.*, 2006).

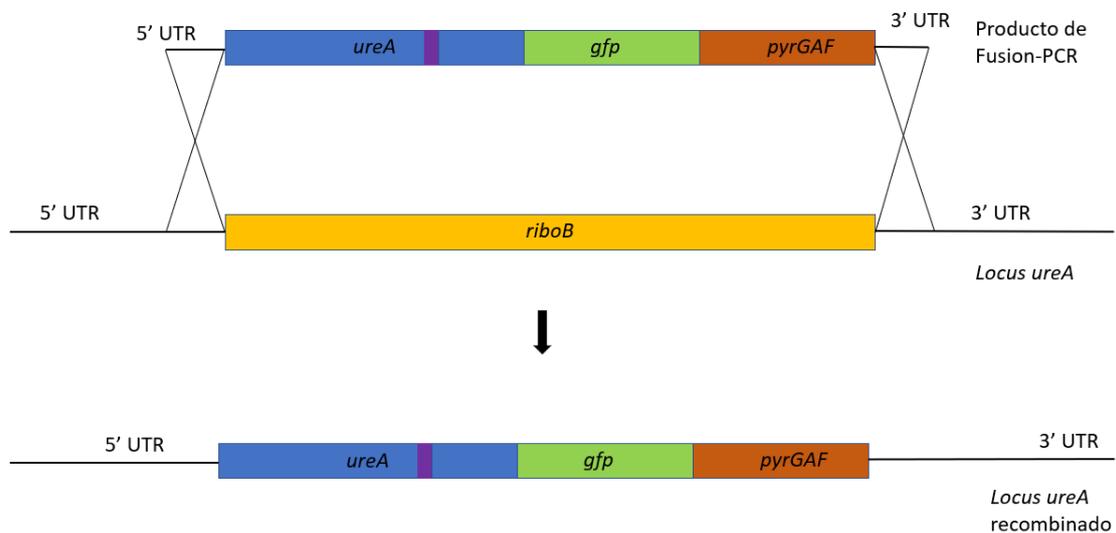


Figura 10: Integración de la construcción génica generada en la cepa de interés mediante recombinación homóloga.

2.2.3 Análisis de las cepas generadas

2.2.3.1 Ensayos de crecimiento en placa

Una vez que obtenidos los transformantes, se procedió a realizar un análisis de crecimiento en placa en distintas concentraciones de urea y 2-tiourea, para observar el fenotipo del transformante comparado con un control *wild-type* (WT) y una cepa $\Delta ureA$. De esta manera se pudo determinar si la mutación introducida tuvo algún efecto en el crecimiento en estas condiciones.

2.2.3.2 Determinación del número de copias de la construcción transformada por qPCR

Si bien el gen *nkuA* se encuentra deletado y la probabilidad de una integración en otra parte del genoma por recombinación heteróloga es baja, ésta puede ocurrir. Para

determinar si los transformantes obtenidos son monocopia (es decir, la construcción se integró únicamente en el locus *ureA*), se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) para la determinación del número de copias del gen *ureA* presente en transformantes seleccionados.

La qPCR es una técnica de biología molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A diferencia de la PCR a tiempo final, la qPCR monitorea la amplificación de su objetivo en tiempo real y no a tiempo final. Para la detección de los productos en tiempo real, se pueden usar marcadores fluorescentes no específicos que se intercalan con ADN de doble cadena o sondas de ADN de secuencia específica la cual consisten de oligonucleótidos que están marcados con un marcador fluorescente, el cual permite la detección solamente luego de hibridarse con su secuencia complementaria (Heid *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1993; Nazarenko *et al.*, 1997). Entre los primeros encontramos al SYBR Green I, un agente intercalante que se une al surco menor de la doble hebra de ADN independiente de la secuencia. Este tipo de detección de productos por métodos no específicos se puede utilizar cuando tenemos un único producto de amplificación, confiriéndonos la ventaja adicional del análisis de las curvas de *melting* para poder tener una caracterización de la secuencia en base a sus temperaturas de fusión (T_m), la cual depende de la longitud del fragmento a amplificar y la composición de bases nitrogenadas.

El análisis de los datos se basa en las curvas de amplificación de las reacciones, las cuales presentan 3 fases características. La primera, o la fase inicial, es aquella donde no se detecta amplificación significativa de producto; la segunda, o fase exponencial, es aquella donde se observa una amplificación de manera exponencial del producto deseado, donde se observa una correlación entre el número de producto amplificado y el tiempo transcurrido de reacción; y una tercera fase, o fase de meseta, donde ya no existe amplificación debido a exhausto de reactivos. El análisis se lleva a cabo con los datos obtenidos en la fase exponencial, ya que como mencionamos antes existe una relación directa entre moléculas generadas y tiempo de reacción. De este modo, es posible obtener el número de copias del molde a partir del número de ciclos necesarios para que la señal pase de la fase inicial a la fase exponencial, fenómeno conocido como el umbral; donde se intersecta el valor umbral con la curva en fase exponencial es donde encontramos el *threshold value*, o C_t .

Para determinar el número de copias, se hizo uso de un método de cuantificación relativo, el cual relaciona la señal del gen de interés de una muestra experimental (en este caso, de una cepa con número de copias desconocido de *ureA*) con una de una muestra control (en este caso, una cepa con copia única de *ureA*). A su vez, la señal

debe ser estandarizada debido a que no todas las muestras pueden contener la misma concentración total de ADN. Para esto, se normaliza la señal del gen de interés para cada muestra con un gen de referencia. En nuestro caso, se optó por usar el gen de la β -actina, ya que sabemos que se encuentra en copia única en las cepas a analizar, así como en la cepa control.

Para calcular el cociente de expresión relativa en base a la diferencia entre los C_t , se utilizó el método “delta-delta C_t ” (Ecuación 1)(Livak *et al.*, 2001).

Esencialmente, el método de delta-delta C_t es la diferencia entre los valores de delta C_t de las muestras experimentales/tratadas y las muestras no tratadas/controles, siendo el “delta C_t ” la diferencia entre los valores de C_t para nuestro gen de interés y el gen normalizador para cada muestra.

Ecuación 1

$$R = \frac{(C_{t_{\text{calibrador}}} - C_{t_{\text{tratado}}})_{\text{gen de interés}}}{(C_{t_{\text{calibrador}}} - C_{t_{\text{tratado}}})_{\text{gen de referencia}}}$$

En nuestro caso, la muestra control (o calibradora) es aquella la cual sabemos que el gen *ureA* se encuentra en monocopia (MVD10A y/o MVD001).

Un valor de R igual o aproximado a 1 nos sería indicativo de que el gen se encuentra en estado de monocopia, un R igual o aproximado a 2 nos indicaría 2 copias, y así sucesivamente.

2.2.3.3 Determinación de la localización subcelular

Con el fin de determinar si las mutaciones generadas en la N279 tienen un efecto en la localización subcelular (es decir, si las versiones mutantes de UreA llegan a la membrana plasmática del organismo), se comprobó la localización de las proteínas mutantes mediante microscopía de epifluorescencia. Esto es posible ya que como se mencionó anteriormente, el gen *ureA* se encuentra fusionado al gen que codifica para la GFP. La proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* en inglés- GFP), originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria*, es un marcador atractivo para seguir la expresión génica y localización proteica en las células vivas (Chalfie *et al.*, 1994). Este cromóforo es formado como resultado del plegamiento de la proteína y la fluorescencia no requiere ningún factor extrínseco excepto luz azul o UV. Por tanto, las células vivas pueden ser observadas con una perturbación mínima y las actividades intracelulares pueden ser observadas directamente.

En *A. nidulans*, este sistema ha sido utilizado extensivamente para seguir niveles de expresión por el promotor *alcA* (Fernandez-Ábalos *et al.*, 2002), para seguir el destino de varios transportadores como el transportador de purinas UapC (Valdez-Taubas *et al.*, 1999), entre otros. Como se mencionó anteriormente, la fusión del gen de *ureA* con la GFP no afecta la funcionalidad de la proteína (Abreu *et al.*, 2010).

2.2.3.4 Análisis de niveles de síntesis proteica a través de Western Blot

Con la finalidad de determinar si las mutaciones generadas en la N279 tienen un efecto a nivel de la síntesis proteica de la proteína, se procedió a realizar un Western Blot con anticuerpo anti-GFP (ver Materiales y Métodos). El Western Blot es una técnica analítica ampliamente utilizada en la biología molecular para detectar proteínas específicas en una muestra de tejido homogeneizado o extracto proteico. Éste se lleva a cabo en 3 etapas: separación por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (o SDS-PAGE), transferencia a un soporte sólido (generalmente a una membrana de nitrocelulosa) y visualización de proteínas mediante el uso de anticuerpos primarios y/o secundarios (Mahmood *et al.*, 2012). En nuestro caso, los niveles de síntesis de UreA-GFP fueron monitoreados mediante la detección por anticuerpos anti-GFP.

3 Resultados y discusión

3.1 Generación de mutantes N279A y N279Q

3.1.1 Producción de la construcción génica para llevar a cabo la generación de mutantes

Con el fin de generar los mutantes del gen *ureA* se realizó, mediante la técnica de Fusion PCR, la construcción de las distintas construcciones génicas (Figura 9).

Se procedió a generar los dos fragmentos correspondientes para cada mutante (ver Sección 2.2.1), siendo éstos F1A y F1Q para los fragmentos 5' de las mutaciones N279A y N279Q respectivamente; y F2A y F2Q para los fragmentos 3' de las mutaciones N279A y N279Q respectivamente.

Para generar dichos fragmentos por PCR se utilizó como molde ADN genómico proveniente de la cepa MVD10A (ver Materiales y Métodos). Esta cepa tiene como característica que posee la fusión *ureA::gfp::pyrGAF* integrada al locus *ureA*. Es decir, el gen *ureA* está fusionado al gen que codifica para la GFP y a su vez posee el marcador de selección *pyrGAF*.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) para analizar los productos de PCR (Figura 11).

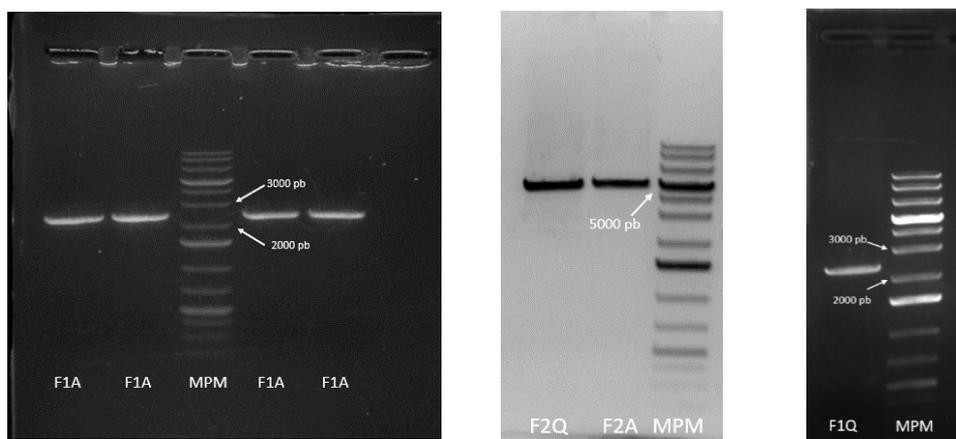


Figura 11: Electroforesis en geles de agarosa 1% para el análisis de los productos de la primera ronda de PCRs (3 μ l de carga). Cada gel con su respectivo marcador de peso molecular (MPM, 4 μ l).

En éstas se observó que la amplificación de los distintos fragmentos fue exitosa y no tenemos amplificación inespecífica por los *primers* o ADN contaminante denotado por la ausencia de bandas adicionales. Se destaca que se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado (ver Materiales y Métodos). Se aclara que en el primer gel se muestra el mismo producto debido a que en esa instancia se hicieron pruebas con 4 polimerasas distintas para comprobar su correcto funcionamiento. Para los pasos siguientes, se hizo un *pool* con los 4 productos.

Una vez que comprobamos la correcta amplificación, se procedió a realizar una purificación por kit (ver Materiales y Métodos) de los fragmentos obtenidos para luego realizar la segunda ronda de PCR (Figura 12)(ver Materiales y Métodos).

3.1.1.1 Segunda ronda de PCR: Fusion-PCR

Para llevar a cabo la fusión de los dos fragmentos amplificados para cada mutación correspondiente, se llevó a cabo una Fusion-PCR como se detalló anteriormente. Para

esto, se hizo uso de los *nested primers* URE5N y URE3N para cada amplificación (ver Materiales y Métodos).

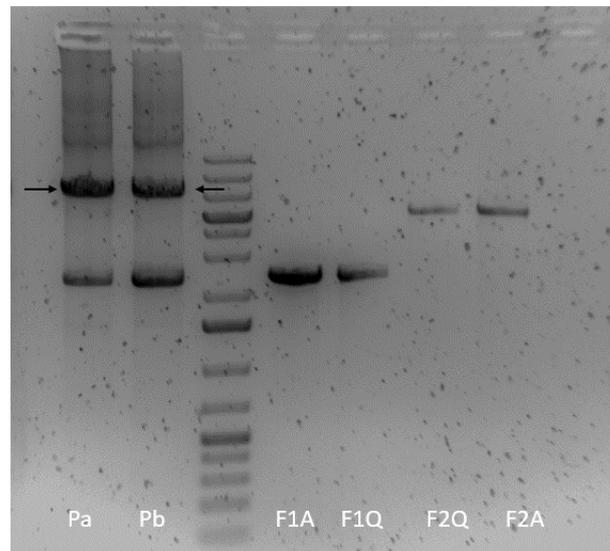


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Pa (Fusion PCR de mutante N279A, 3 μ l), Pb (Fusion PCR de mutante N279Q, 3 μ l), y F1A, F1A, F2A Y F2Q como descritos anteriormente (3 μ l) con marcador de peso molecular (MPM, 4 μ l)

Como podemos observar, tanto la Fusion-PCR del mutante N279A como la del mutante N279Q fueron exitosas denotadas por el producto obtenido que migra cercano a las 7000 pb (se esperaba un amplicón de 7027 pb). Sin embargo, podemos también observar otras bandas con menor tamaño, las cuales poseen el mismo peso molecular que F1A y F1Q, indicando que se trata de la amplificación de los fragmentos pertenecientes a los fragmentos 5' del gen como explicamos anteriormente. Esta amplificación puede deberse a que, al realizarse una purificación directa de dichos fragmentos, hayan quedado *primers* de dichas amplificaciones en el producto purificado y que luego estos *primers* amplificaron los fragmentos F1A y F1Q presentes en las reacciones de Fusion-PCR.

Debido a la ausencia de un único producto en la Fusion-PCR, se procedió a realizar una purificación por gel de la fusión (ver Materiales y Métodos). Para esto, se recortaron las bandas del gel pertenecientes al producto de la Fusion-PCR y se procedió a llevar a cabo el procedimiento de purificación. Una vez realizada la purificación se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa con el fin de corroborar la correcta purificación del amplicón deseado (Figura 13).

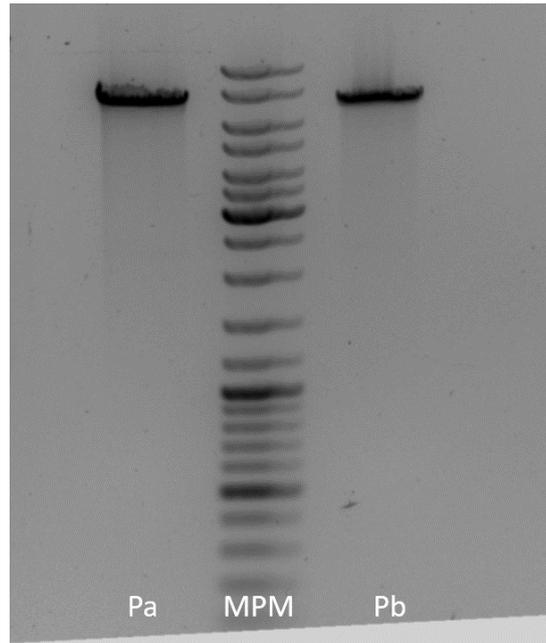


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar las purificaciones de las construcciones: Pa (purificación de construcción de mutante N279A, 3 μ l) y Pb (purificación de construcción de mutante N279Q, 3 μ l) con marcador de peso molecular (MPM, 4 μ l)

3.1.2 Transformación de cepa MVD13A con las construcciones conteniendo las mutaciones

Una vez obtenidas las construcciones génicas, se procedió a realizar la transformación de la cepa MVD13A con las mismas (ver Materiales y Métodos). Dicha cepa a transformar posee un genotipo $\Delta ureA::riboB$ *riboB2* *pyroA1* *pyrG89* $\Delta nkuA::argB$. Es importante notar aquí que esta cepa tiene reemplazado el gen *ureA* por el marcador *riboB*, el cual complementa la mutación *riboB2* (ver Figura 10). Esto confiere una ventaja a la hora de seleccionar los transformantes por dos aspectos. Por un lado, si se da la recombinación homóloga en el locus *ureA* estaremos reemplazando el gen *riboB* por nuestra construcción génica. Al reemplazarlo, le estaremos quitando al hongo la capacidad de crecer sin riboflavina ya que el marcador *riboB* es eliminado producto de la integración de la construcción en el locus deseado. Por esto, si los transformantes no son capaces de crecer en un medio sin riboflavina, sabremos que la integración tuvo lugar en el locus deseado. Por otro lado, nuestras construcciones contienen el gen *pyrGAF* hacia el 3' de la fusión *ureA::gfp*, y la cepa a transformar porta la mutación de pérdida de función *pyrG89* (ver Materiales y Métodos). Gracias a esto, sabremos que nuestra transformación fue exitosa si los transformantes son capaces de crecer en un medio sin uridina y uracilo. Entonces, si nuestra transformación ha sido exitosa, los transformantes de interés:

- No crecerán en un medio sin riboflavina.
- Serán capaces de crecer en un medio sin uridina y uracilo.

Una vez seleccionados los transformantes en base a estas auxotrofías, se procedió a realizar una purificación de los mismos. Esto se debe a que durante el proceso de transformación, la pared celular es removida para generar protoplastos y estos pueden fusionarse durante el proceso de transformación. Esto puede generar la presencia de transformantes heterocariontes (n+n). Es decir, puede tener núcleos transformados (que han integrado nuestra construcción) y núcleos no transformados. Por eso, se procede a realizar una suspensión de esporas de los transformantes obtenidos con el fin de aislar esporas haploides, y al plaquearlas en un medio selectivo (con riboflavina y piridoxina y sin uridina y uracilo). Aquellas colonias que crezcan (a partir de una espora haploide) serán mutantes homocariontes.

Se obtuvieron 5 transformantes para la mutación N279A y 2 para la mutación N279Q que cumplieron con los criterios de selección mencionados anteriormente. No obstante, se obtuvieron transformantes que si bien no fueron capaces de crecer en un medio sin uridina y uracilo (indicando que hubo una recombinación), sí fueron capaces de crecer sin riboflavina. Esto se puede explicar debido a que, si bien se produjo una integración de la construcción génica, esta debe de haber ocurrido en otro lugar del genoma. Por tanto, estos transformantes no entran en el criterio de selección mencionado anteriormente. De cada mutante, se eligió un transformante de cada uno al azar para realizar un secuenciado del mismo.

3.1.4 Secuenciación y análisis de crecimiento en placa

Posterior a la selección, se procedió a secuenciar un transformante de cada mutación generada (T1A y NQ2A) con el fin de comprobar la presencia de la mutación deseada y descartar la presencia de otras mutaciones no deseadas. Para ello se extrajo ADN genómico (ver Materiales y Métodos) el cual se utilizó como molde para amplificar la secuencia genómica del gen *ureA* (Figura 14)(ver Materiales y Métodos).



Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar los productos de PCR para secuenciar. Se amplificó la secuencia genómica del gen *ureA*, esperándose un amplicón de 4950 pb. 3 μ l de sembrado de cada muestra y 4 μ l de MPM.

Una vez confirmado esto, se procedió a realizar los ensayos de crecimiento con los mismos. Para esto, se cultivaron los mutantes en un medio mínimo sólido (1,3% de agar) con los suplementos correspondientes (uridina y uracilo, piridoxina, riboflavina) y con distintas fuentes de nitrógeno: amonio, nitrato, y distintas concentraciones de urea y tiourea (5, 2.5, 1.25 y 0.625 mM). Además de realizar los crecimientos a 37°C, estos se realizaron también a 25°C para evaluar si las mutaciones generadas pueden dar lugar a fenotipos criosensibles, indicativos de defectos en la estructura del transportador (Diallinas, 2008).

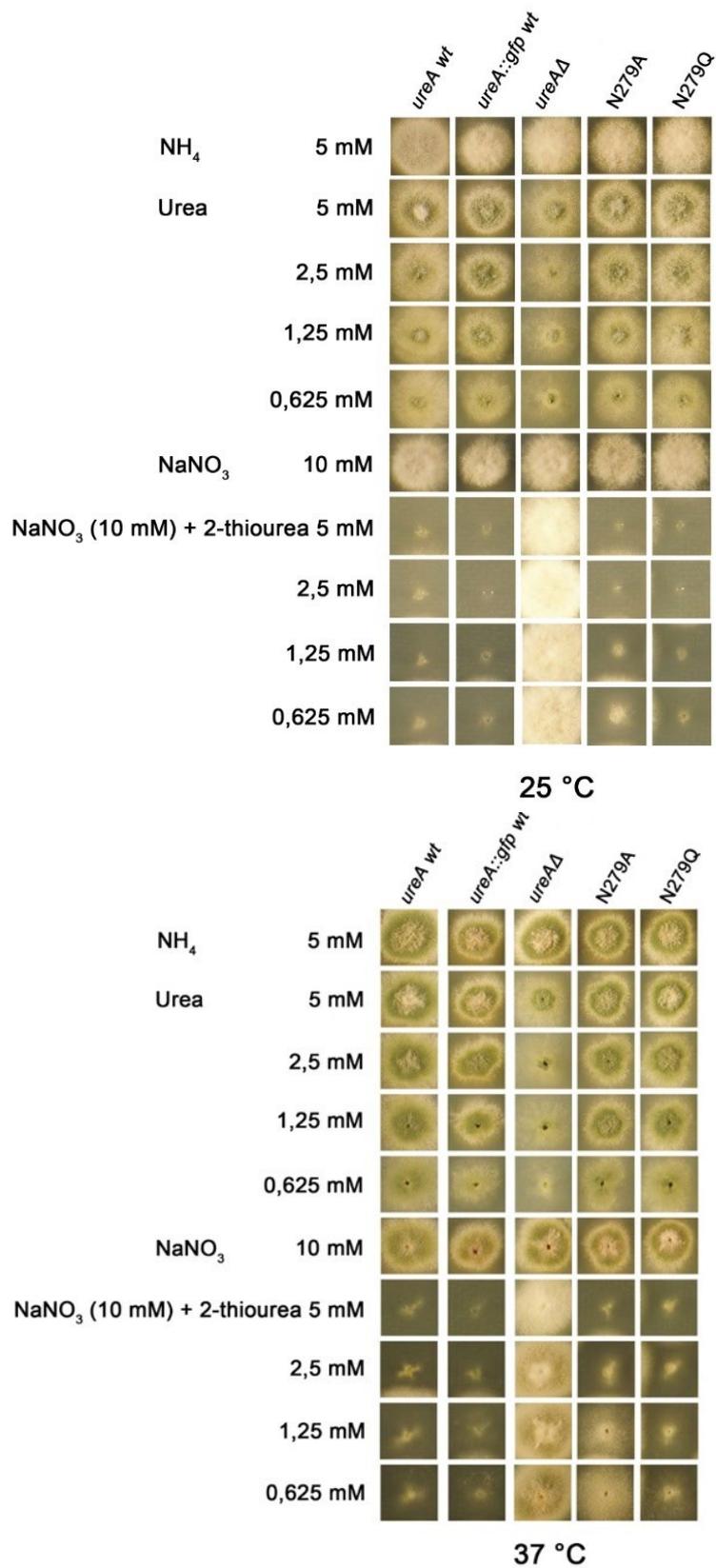
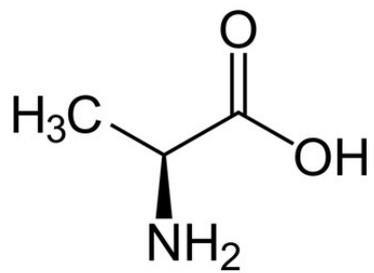
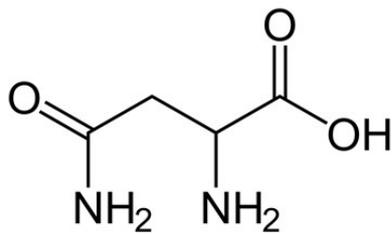


Figura 15: Ensayos de crecimiento en placa a 25 y 37 °C (ver Materiales y Métodos) de las cepas transformantes N279A y N279Q junto con las cepas ureA salvaje (MVD 001 – ureA_salvaje), ureA_salvaje::gfp (MVD 10A) y ΔureA (MVD 13A) como control. Éstas se cultivaron en amonio y sobre diferentes concentraciones de urea y el análogo tóxico 2-tiourea (en este caso se utilizó 10 mM nitrato de sodio como fuente de nitrógeno). Las placas de MM se suplementaron con paba (ácido p-aminobenzoico), uridina, uracilo, riboflavina, piridoxina, y en las placas en las que se utilizó 2-tiourea se suplementaron con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

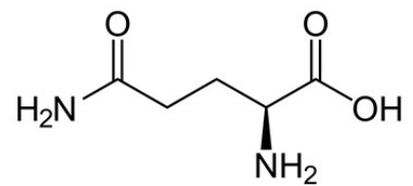
En la Figura 15 (tanto a 25 como a 37°C) podemos observar que las cepas mutantes obtenidas (a partir de ahora, N279A y N279Q) presentan un fenotipo similar al de las cepas salvajes y similar entre ellas en urea. Este fenotipo nos puede indicar que las mutaciones introducidas en cada cepa no causarían un cambio de afinidad por la urea. Por otra parte, al crecer las cepas en 2-tiourea podemos observar diferencias en el crecimiento en la cepa N279A con respecto a las cepas salvajes. A concentraciones bajas de 2-tiourea la cepa N279A presenta un crecimiento moderado que no se observan ni en las cepas control ni en la cepa N279Q. Este es un resultado interesante, ya que estaríamos observando que la naturaleza aminoacídica en esa posición sería importante en lo que respecta a la afinidad por el sustrato: la cepa N279A fue capaz de permitir el pasaje de urea pero ser más restrictiva en el transporte de la 2-tiourea, lo cual nos sugiere que esta mutación en esa posición le confiere un cambio de afinidad por el sustrato a la cepa. Esta diferencia en la afinidad por los distintos sustratos se podría explicar por la diferencia en la estructura de los aminoácidos introducidos (Figura 16). Al realizar el cambio N279Q se mantienen las características polares (y presentan radicales parecidos), por lo que tiene sentido el haber observado un fenotipo similar a la cepa salvaje. Por otra parte, la alanina introducida en el mutante N279A es un aminoácido que tiene características no polares o hidrofóbicas comparadas con la asparagina. Como recordaremos, la tiourea (Figura 5) tiene un átomo de azufre en el lugar del átomo de oxígeno que porta la urea (Figura 2). Al ser el azufre menos electronegativo, esta molécula es menos polar que la molécula de urea. Por esto, no es de llamar la atención que la tiourea presente mejor transporte en aquellos transportadores conteniendo aminoácidos más polares, como es el caso de las cepas salvajes y N279Q. Al estar la mutación en el sitio de unión de sustrato en el transportador y al ser la alanina menos polar, esta dificulta más el paso de la tiourea por el transportador, posiblemente confiriendo este fenotipo selectivo que se observa a menores concentraciones de tiourea. Por lo que la mutación N279A parece estar afectando la interacción con la tiourea y por lo tanto reduciendo la afinidad del transportador por ésta.



Alanina



Asparagina



Glutamina

Figura 16: Representaciones de los aminoácidos alanina (A), asparagina (N) y glutamina (Q)

3.2 Determinación del número de copias de la construcción transformada por qPCR

Para determinar el número de copias en las cepas mutantes generadas (verificadas por secuenciación), se procedió a realizar una qPCR (Ver Sección 2.2.3.2), utilizando como molde ADN genómico. El ADN genómico de las cepas MVD10A y MVD001 fue utilizado como control (*ureA* monocopia). Evaluamos el número de copias de nuestro gen problema *ureA* comparándolo contra el gen monocopia *actA* (que codifica para la actina). Como se mencionó, nuestras muestras problema (N279A y N279Q) se compararon con las muestras calibradoras MVD10A y MVD001, ya que ya sabemos que estas cepas son monocopia para el gen *ureA*.

Tabla 1: Resultados de la qPCR indicando ciclo donde se superó el nivel umbral (Cts), los cálculos de deltaCt (ct calibrador – ct mut) y el R mostrando los valores de “delta-delta Ct”

<i>ureA</i>	<i>ureA</i>		<i>actA</i>		R		
	Cts	Promedios	Ct calibrador - Ct mut	Ct calibrador - Ct mut			
MVD 001	16,270	16,220	1,074	1,098	0,98	Usando MVD 10A como calibrador	
	16,170						
MVD 10A	17,256	17,294					
	17,331						
N279A	15,374	15,338	1,956	2,102	0,93		
	15,302						
N279Q	18,866	18,716	-1,423	-1,094	1,30		
	18,566						
<i>actA</i>							Usando MVD 001 como calibrador
MVD 001	15,606	15,524					
	15,441						
MVD 10A	16,581	16,622	-1,074	-1,098	0,98		
	16,662						
N279A	14,524	14,520	0,882	1,004	0,88		
	14,515						
N279Q	17,731	17,715	-2,496	-2,192	1,14		
	17,699						

Como se observa en la tabla de resultados, como era de esperar las cepas MVD001 y MVD 10A ambas son monocopia para el gen *ureA* demostrado por el valor de R cercano a 1. Por otro lado, también se observa que ambas cepas mutantes presentan el gen de *ureA* en monocopia. Esto es importante para el análisis ya que de no haber sido así, el hecho que sea de copia múltiple podría causar “ruido” en el análisis debido a que podría estar sucediendo una sobreexpresión de nuestro transportador, y nos interesa evaluar los fenotipos de los mutantes con el mismo número de copias que la cepa salvaje.

Dicho esto, de haber sido de copia múltiple, una solución para generar mutantes monocopia sería cruzarlos con cepas monocopia para el gen *ureA* (como por ejemplo la MVD10A) y de esta manera obtendríamos algunos mutantes monocopia.

3.3 Análisis de niveles de síntesis proteica a través de Western Blot

Con la finalidad de determinar si las mutaciones generadas en la N279 tuvieron un efecto a nivel de la síntesis proteica de la proteína, se procedió a realizar un Western Blot con anticuerpo anti-GFP (ver Materiales y Métodos).

Se realizó una extracción de proteínas de las cepas mutantes y de la cepa MVD10A (como control) las cuales fueron cuantificadas mediante el método del BCA, y se procedió a realizar el Western Blot (ver Materiales y Métodos).

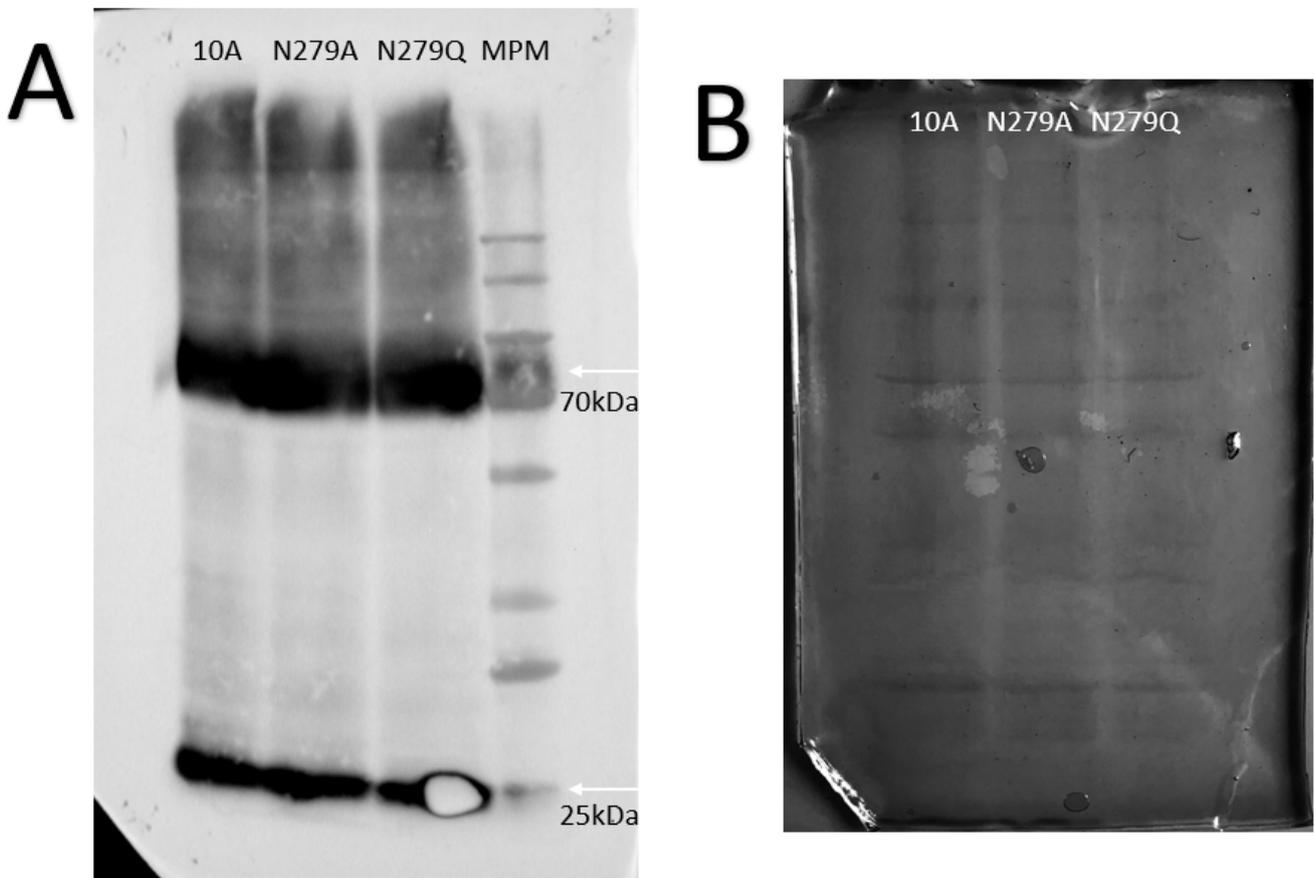


Figura 17: A: Revelado de Western Blot de MVD10A, N279A y N279Q (100 μ g de proteína) con anticuerpo anti-GFP (dilución 1/2500) mostrando dos bandas claras, una a 70 kDa (correspondiente a la fusión UreA-GFP) y otra a 25 kDa (GFP libre). B) Tinción de Azul de Coomassie de gel SDS-PAGE como control de carga de MVD10A, N279A Y N279Q (100 μ g).

Como se puede observar en la Figura 17A, el revelado con anticuerpo anti-GFP resultó en la presencia de dos bandas en la membrana. Estas dos bandas, como se puede correlacionar con el marcador de peso molecular, se ubican en los pesos aproximados de 70 kDa y 25 kDa. La proteína UreA-GFP migra entre 60 y 80 kDa (Sanguinetti *et al.*, 2014),

por lo que podemos asumir que la banda situada alrededor de los 70 kDa corresponde a la fusión UreA-GFP. En base a esto, podemos observar que no existen diferencias en las intensidades de banda observadas entre la cepa control (MVD10A) y las cepas mutantes. Esto nos podría indicar que las mutaciones introducidas no estarían interfiriendo con la síntesis del transportador y que el fenotipo observado en placa no se debe a un defecto en la cantidad de transportador sintetizado.

Por otra parte, podemos observar otra banda en el torno de los 25 kDa. Esta banda corresponde a la presencia de GFP libre. Este fenómeno es esperable, ya que la GFP es refractaria a la proteólisis (Chiang *et al.*, 2001) y por lo tanto puede ser detectada aún cuando la proteína fusionada a ésta sea degradada. Además, esta degradación de UreA-GFP es producto del recambio proteico normal producido en la célula. Por tanto, al estar revelando con un anticuerpo anti-GFP y sabiendo que la proteína GFP migra alrededor de los 27 kDa, no nos es inesperado observar una señal correspondiente a la misma. Es importante mencionar que una mayor presencia de GFP libre en el extracto proteico indicaría una mayor degradación de UreA-GFP y viceversa. Sin embargo, no se observan diferencias entre UreA-GFP y sus versiones mutantes.

A su vez, podemos observar un defecto en el revelado en el carril N279Q. Este se debe seguramente a un error técnico en preparación de la transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa, ya que en este paso es muy común que queden atrapadas burbujas de aire las cuales impiden una correcta transferencia hacia la membrana.

En la Figura 17B se muestra la tinción con azul de Coomasie de un gel SDS-PAGE de los extractos proteicos correspondientes a MVD10A, N279A y N279Q. Debido a dificultades técnicas a la hora de detectar la actina como control de carga (con anticuerpo anti-actina), se optó por realizar esta tinción como reemplazo utilizando la misma cantidad de extracto proteico utilizado en el Western Blot. Los controles de carga suelen ser proteínas que exhiben una expresión constitutiva y de alto nivel en el tipo de muestra en estudio. Se utilizan para normalizar los niveles de proteína detectados confirmando que la carga de proteína es la misma en todos los carriles. Éstos son esenciales para garantizar la fiabilidad de los datos a la hora de comparar la expresión de una proteína en diferentes muestras.

Cabe aclarar que si bien este método es útil a la hora de utilizarlo como control de carga, se está poniendo a punto en el laboratorio la detección de la tubulina con anticuerpo anti-tubulina como reemplazo.

3.3.1.1 Determinación de la localización subcelular

Para verificar que las mutaciones introducidas no interferían con la localización del transportador en la membrana plasmática de la célula, se procedió a determinar su localización subcelular (ver Sección 2.2.3.3) mediante microscopía de epifluorescencia (ver Materiales y Métodos) (Figuras 18 y 19).

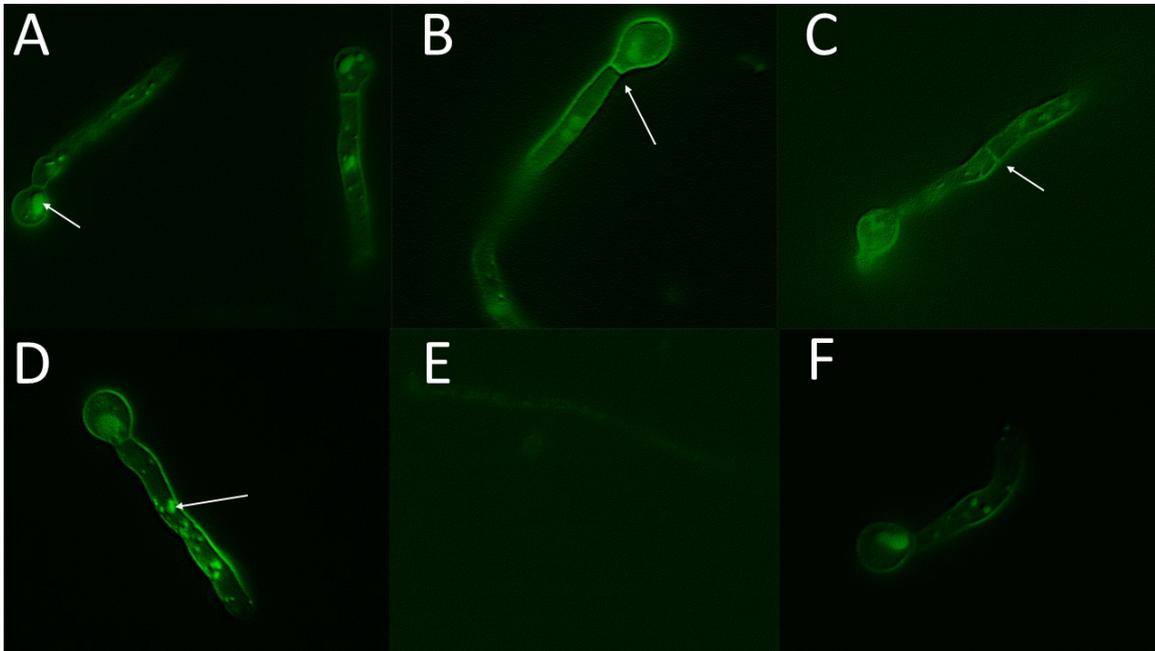


Figura 18. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de mutantes N279A (A-D), cepa MVD 001 (*ureA* salvaje) (E) y cepa MVD10A (*ureA::gfp*) (F). Estas dos últimas como control negativo (autofluorescencia) y positivo, respectivamente. Aumento 100X, excitación con luz azul, $\lambda = 490$ nm. Las cepas fueron crecidas a 25°C por 16 horas en medio mínimo conteniendo prolina 5 mM como fuente de nitrógeno. Las flechas señalan septos y vacuolas.

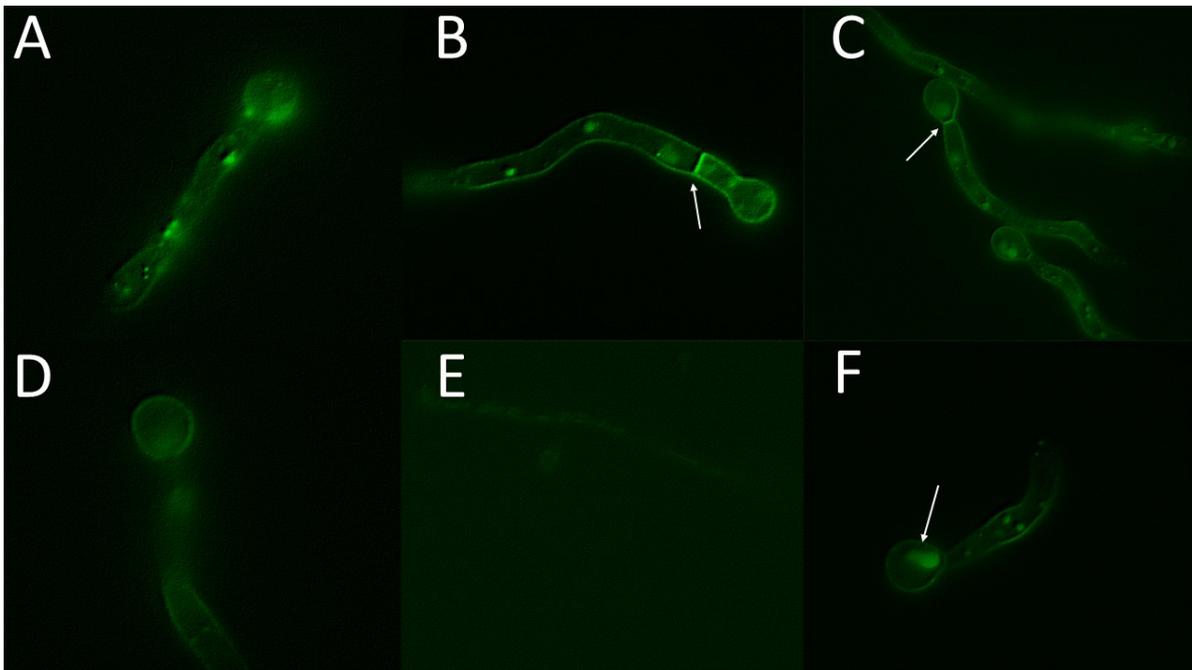


Figura 19: Imágenes de microscopía de epifluorescencia de mutantes N279Q (A-D), cepa MVD 001 (*ureA* salvaje) (E) y cepa MVD10A (*ureA::gfp*) (F). Estas dos últimas como control negativo (autofluorescencia) y positivo, respectivamente. Aumento 100X, excitación con luz azul, $\lambda = 490$ nm. Las cepas fueron crecidas a 25°C por 16 horas en medio mínimo conteniendo prolina 5 mM como fuente de nitrógeno. Las flechas señalan septos y vacuolas.

A partir de los resultados obtenidos, se observa que la cepa MVD 001 (*ureA* salvaje) emite una señal de fluorescencia bastante baja (producto de auto-fluorescencia). Esto es completamente esperable, ya que en esta cepa el gen *ureA* no se encuentra fusionado al gen *gfp*. Por otro lado, podemos observar que los fenotipos de ambos mutantes comparado con la cepa MVD10A (*ureA::gfp*) son similares. Se observa una clara señal en la membrana plasmática, así como en septos (localización característica de transportadores de membrana en *A. nidulans*) en ambos mutantes y la cepa MVD10A, lo que nos estaría indicando que las mutaciones introducidas no estarían afectando la localización subcelular del transportador en la membrana plasmática. Esto era esperable, ya que en los análisis de crecimiento en placa se observó que ambas cepas eran capaces de crecer en urea y presentaban sensibilidad (en distinto grado) a la 2-tiourea. Si el transportador mutado no pudiese llegar a la membrana plasmática (y quedar, por ejemplo, retenido en el retículo endoplásmico como resultado de un defecto en el plegamiento), las cepas no presentarían este fenotipo.

Por otra parte, se observa señal de GFP en gránulos citoplasmáticos. Estos corresponden con vesículas que están llevando al transportador hacia la membrana plasmática y a vesículas que lo dirigen a vacuolas (equivalente a los lisosomas de mamíferos, donde se produce una degradación proteica; se observan como gránulos citoplasmáticos de mayor tamaño, localizados mayoritariamente en la espora). Esto es resultado de un recambio natural de la proteína en la célula. La acumulación de UreA-GFP en el lumen de estas vacuolas puede servir como un indicador de la degradación de la proteína. Como se puede observar, ambos mutantes presentan un fenotipo similar al de la cepa MVD10A, lo que nos estaría indicando que las mutaciones introducidas tampoco estarían produciendo una mayor degradación de la proteína, ya que de ser así esperaríamos ver señal de GFP principalmente en vacuolas. Esto se corresponde con los resultados obtenidos en el Western Blot, en donde no se observó una mayor intensidad de GFP libre, lo que sería indicativo de una mayor degradación de la proteína.

4 Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se lograron introducir las mutaciones N279A y N279Q con éxito por medio de la generación de construcciones génicas por la técnica “Fusion-PCR” y su posterior transformación. Mediante la generación de esta mutación, se pudo determinar que la N279 de UreA tendría un rol en la afinidad por el sustrato de la urea. Los resultados indicarían que las características polares de dicho aminoácido serían importantes para la afinidad por sus sustratos. Dicha hipótesis podría ser confirmada mediante experimentos de cinética de transporte (Kryptou & Diallinas, 2014) con urea marcada radioactivamente (^{14}C -urea) sobre las cepas mutantes N279A y N279Q.

En cuanto al efecto de las mutaciones introducidas en la síntesis y localización subcelular de UreA, se determinó que éstas no se vieron afectadas ya que se obtuvieron fenotipos similares a las cepas controles en los ensayos de microscopía de epifluorescencia y Western Blot, por lo que el fenotipo observado mediante los análisis de crecimiento en placa se debe exclusivamente al cambio aminoacídico introducido.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten una mayor comprensión en la relación estructura-función de UreA, más precisamente en la identificación del sitio de unión a sustrato. UreA constituye un modelo para la caracterización de sus ortólogos en plantas. La urea es el principal fertilizante nitrogenado a nivel mundial, particularmente en países en desarrollo. Sin embargo, la degradación de ésta por ureasas de bacterias y hongos del suelo lleva a que ésta sea absorbida por plantas principalmente bajo forma de amonio. Asimismo, esto genera la liberación de cantidades significativas de amonio y derivados tóxicos al medio ambiente y pérdidas millonarias por volatilización del nitrógeno aplicado (Zanin *et al.*, 2015). El estudio de la estructura y función de estos transportadores puede constituir un punto de partida para el desarrollo de estrategias que permitan un aprovechamiento más eficiente de la urea aplicada, ya sea mediante el desarrollo de nuevos fertilizantes y/o técnicas de aplicación de los mismos, o incluso de cultivos con una eficiencia mejorada en cuanto al uso de esta fuente nitrogenada.

5 Materiales y métodos

5.1 Genotipo y fenotipo de cepas empleadas

Cepa	Genotipo
MVD001	<i>wt pabaA1</i>
MVD10A	<i>ureA::gfp::pyrGAF pyrG89 pyroA4 riboB2 delta_nkuA::argB</i>
MVD13A	<i>ΔureA::riboB riboB2 pyroA1 pyrG89 ΔnkuA::argB</i>

5.1.1 Descripción de los genotipos y fenotipos

- *pabaA1* es el alelo responsable de la auxotrofia para el ácido p-aminobenzoico.
- *pyroA1* es el alelo responsable de la auxotrofia para la piridoxina.
- *pyrG89* es el alelo responsable de la auxotrofia para la uridina y el uracilo
- *riboB2* es un alelo del gen *riboB* que provoca la auxotrofia por la riboflavina (vitamina B2)
- *ureA::gfp* es el gen que codifica para el transportador UreA de *A. nidulans* fusionado a la *gfp* (gen que codifica para la proteína verde fluorescente).
- *ΔureA::riboB* es la sustitución de la secuencia codificante del gen *ureA* por el gen *riboB*, que complementa la auxotrofia provocada por el alelo *riboB2*.
- *ΔnkuA::argB* es la delección, por sustitución de la secuencia codificante del gen *nkuA* por el gen *argB* (codifica para la ornitil carbamil transferasa, la cual cataliza la conversión de ornitina a citrulina, un precursor de la arginina), del gen *nkuA* el cual es esencial para la recombinación no homóloga del ADN en la reparación de roturas de doble cadena.

5.2 Condiciones de cultivo

A partir de una inoculación de conidias sobre medio sólido, luego de 48 horas a 37 °C (o 72 hs a 25 °C) se desarrolla una colonia de forma compacta que permite la visualización de caracteres fenotípicos. Para lograr una placa con crecimiento confluyente se realiza un estriado de esporas y se incuba como se mencionó anteriormente.

5.3 Medios de cultivo

Los medios se preparan y se utilizan según lo recomendado por Pontecorvo y colaboradores (1953). Pueden ser utilizados para cultivos líquidos o sólidos agregando 1.3 % o 3 % de agar cuando las placas sean utilizadas para coleccionar esporas.

Medio mínimo (MM):

- 20 ml de solución de sales
 - 10 g de glucosa (dextrosa)
- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 121 °C).
- Observación: Este medio debe complementarse con una fuente de nitrógeno y con los suplementos nutricionales requeridos según las auxotrofias de la cepa cultivada.

Medio Completo (MC):

- 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
 - 1 g de extracto de levadura
- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 121 °C).
- Observación: cuando este medio es empleado para cultivar cepas auxótrofas para la arginina, la riboflavina, la adenina o el uracilo y la uridina, es necesario agregar estos suplementos al medio completo.

Medio para la regeneración de protoplastos (isosmótico):

- 20 ml solución de sales
 - 10 g de glucosa (dextrosa)
 - 342.3 g de sacarosa
- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 105 °C).
- Observación: se toman las mismas consideraciones en cuanto a las fuentes de nitrógeno y suplementos nutricionales que el MM.

Solución de Sales:

- 26 g de cloruro de potasio

-
- 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado
 - 76 g fosfato de potasio monobásico
 - 50 ml de solución de elementos traza
- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C). Se almacena a 4 °C.

Solución de Vitaminas:

- 50 mg de tiamina-HCl (o aneurina)
 - 10 mg de biotina
 - 100 mg ácido nicotínico
 - 200 mg pantotenato de calcio
 - 50 mg piridoxina-HCl
 - 100 mg riboflavina
 - 500 mg ácido p-aminobenzóico.
- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4 °C.

Solución de Elementos Traza:

- 40 mg borato de sodio decahidratado
 - 400 mg sulfato de cobre pentahidratado
 - 800 mg fosfato férrico dihidratado
 - 800 mg sulfato de magnesio dihidratado
 - 800 mg molibdato de sodio dihidratado
 - 8 g sulfato de zinc heptahidratado
- Se lleva a un litro con agua destilada

Solución de Casaminoácidos:

- 150 g caseína hidrolizada
- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C) y se conserva a 4 °C.

Suplementos nutricionales de *A.nidulans*: las soluciones, salvo que se especifiquen otras condiciones, se preparan 100 veces concentradas en agua destilada con respecto a la concentración final de trabajo. Se esterilizan mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C) y se conservan a 4 °C.

Suplemento	Concentración de la solución stock (100X)
Amonio (tartrato de)	9,2 g/100ml
Nitrato de sodio	0.85 g/100ml
2-Tiourea (*)	3.81 g/100 ml
Uracilo	61 mg/ml
Piridoxina HCL (vit. B6)	500 mg/100ml
D-Biotina	10 mg/100ml
Ácido p-aminobenzoico (paba)	9.2 g/100 ml
Urea (*)	3.03 g/100 ml
Uridina	56 mg/ml
Riboflavina	25 mg/100 ml

(*)soluciones que se esterilizan por filtración.

5.4 Técnicas empleadas con *A. nidulans*

5.4.1 Transformación de *A. nidulans*

5.4.1.1 Producción de protoplastos

1. El día previo a la transformación se inoculan 400 mL de MM (con los suplementos correspondientes) con una suspensión de esporas, generada a partir de 2 placas de la cepa en cuestión crecidas de manera confluyente, en 15 mL de Tween 80 -4 (0.01%).
2. Se incubaba de **11 a 12 horas** a 30 °C con agitación fuerte (140 r.p.m). Se observa al microscopio, y se detiene la observación cuando las esporas hayan comenzado a germinar. Para obtener una buena cantidad de protoplastos es muy importante que el cultivo sea joven.
3. El cultivo se filtra sobre blutex, se lava el micelio con agua estéril y seca entre hojas de papel estériles.

4. El micelio seco se pesa por diferencia en un falcon estéril y se resuspende en solución B, a razón de 10 mL/gr de micelio (usar 3 g de micelio). **Se mezcla bien con vortex** para favorecer la actividad de las enzimas.
5. Se transfiere a **matraz estéril** y se agrega la enzima comercial GLUCANEX a razón de 400 mg/g de micelio (también puede utilizarse Novozima a razón de 20 mg/g de micelio).
6. Se añaden **3 a 7 mg** (una puntita de espátula) de albúmina de suero bovino (BSA) **por gr de micelio** y se incuba con agitación suave (100 rpm) a 30°C durante 2-2.5 hs. La formación de protoplastos se sigue al microscopio.
7. La suspensión de protoplastos se transfiere a tubos Corex estériles, **se vortexea suavemente** y se agrega lentamente por las paredes del tubo un volumen igual de solución D. Se forman 2 capas. Los tubos deben mantenerse en hielo.
8. Se centrifuga 10 minutos a 6000 rpm (en rotor vasculante de 142 mm de radio, **poner freno 0 en todas las centrifugaciones**) a 14°C. Los protoplastos formarán una capa blanca en la interfase que se transfiere con pipeta Pasteur a otro tubo Corex estéril.
9. Los protoplastos recuperados son lavados agregando 5-10 mL de solución E y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm.
10. Los protoplastos se resuspenden en 5 mL de solución G, se realiza el recuento de los mismos en célula de Thoma, y luego se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm.
11. Una vez finalizada la centrifugación se resuspenden los protoplastos en solución G de tal manera que se obtenga una concentración de $2-5 \times 10^7$ protoplastos/100 μL .

5.4.1.2 Transformación

Importante: antes de comenzar, la solución PEG se debe vortexear y calentar (en baño de agua a aprox. 50 °C) para resuspender cualquier precipitado de PEG que se encuentre presente (ya que el PEG luego de un tiempo a T ambiente precipita).

1. A 100 μL de suspensión de protoplastos, agregar ADN (**no menos de 250 ng totales**) en un volumen menor a 15 μL de Buffer TE y preferiblemente en menos de 10 μL .
2. Vortexear 6-8 veces por 1 segundo a máxima velocidad. Aunque esto genere una pérdida de protoplastos, es mejor perder algunos protoplastos que fallar en mezclar enteramente el ADN con los protoplastos.
3. Agregar 50 μL de Solución de PEG recién filtrada (que este a temperatura ambiente).

Importante: Para minimizar cualquier lisis de protoplastos debido a un posible residuo de detergente en el filtro, **filtrar primero 1 o 2 mL de solución PEG, descartar y colectar el resto (en Falcon de 15 mL estéril)**. La solución de PEG no debe ser mantenida en hielo antes de ser añadida. El enfriamiento de la solución causa la precipitación del PEG. Cuando se mezcla el PEG con los protoplastos, el precipitado de PEG causa la lisis de los protoplastos y por lo tanto reduce la frecuencia de transformación.

4. Vortexear 3-4 veces por 1 segundo a máxima velocidad.
5. Poner en hielo por 25 minutos.
6. Agregar 1 mL de **solución de PEG recién filtrada** (que este a temperatura ambiente, primero filtrar 1-2 mL, descartar, y luego continuar filtrando). Mezclar la solución PEG con la suspensión de protoplastos mediante el uso de una micropipeta (tomando cierto volumen para luego tirarlo nuevamente en la solución, hacerlo por lo menos 10 veces). Dejar a T ambiente por 25 minutos. Si la transformación es exitosa, protoplastos fusionados pueden ser observados en la mezcla de transformación.
7. Plaquear la mezcla de transformación en placas de selección. Las placas deben tener 1.0 M Sacarosa más los suplementos correspondientes para la selección. **Deben estar bien secas.** Para placas de Petri de 100 mm de diámetro, utilizar 115 μ L de mezcla de transformación para que pueda ser plaqueada por toda la superficie de la placa. Si se quiere plaquear un volumen menor, se puede poner un cierto volumen de solución PEG arriba de la placa y a ese volumen agregarle el volumen de mezcla de transformación deseado (volumen de mezcla de transformación + solución PEG = alrededor de 100 μ L)
8. Incubar inicialmente las **placas overnight boca arriba** a 30 °C o 37 °C. Al otro día las placas deben ser invertidas.

Nota: Luego de una incubación inicial a 30 °C, durante la cual se forman las paredes celulares, las placas pueden ser transferidas a 37 °C. La producción de esporas por las colonias transformantes son generalmente visibles al tercer día.

5.4.1.3 Soluciones de transformación

B: 1.2 M $MgSO_4$, 10 mM ortofosfato (pH 5.8)

Pesar el $MgSO_4$, agregar H_3PO_4 y agua (no completar a volumen), agitando con agitador magnético, agregar de a poco NaOH (**1 N o menos concentrado**); cuando se disuelve el precipitado medir pH, no pasar de pH 6 porque se forma un precipitado insoluble. **Se filtra, no se esteriliza.**

D: 0.6 M Sorbitol, 100 mM Tris Cl (pH 7.5). **Se esteriliza por autoclave.**

E: 1 M Sorbitol, 10 mM Tris Cl (ph 7.5). **Se esteriliza por autoclave.**

G: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl₂. **Se esteriliza por autoclave.**

PEG: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl₂, 75 mM PEG (= 25% w/v). **Se esteriliza por autoclave. Se filtra antes de usar.**

5.4.2 Extracción de proteínas

- 1) Inocular 200 mL de MM líquido con una suspensión de esporas generada a partir de una placa con crecimiento confluyente de la cepa en cuestión, Overnight a 37 °C.
- 2) Moler el micelio en presencia de nitrógeno líquido (moler bien, al menos 4-5 veces, tiene que quedar como un polvo blanco).
- 3) Tomar ~200 – 300 µL de micelio molido en un eppendorf de 2 mL.
- 4) Resuspenderlo en 1 mL Buffer de Precipitación (dar vuelta el tubo y darle chicotazos hasta que el micelio del fondo del tubo se separe del mismo).
- 5) Vortexear bien por 10-20 segundos.
- 6) Pipetear unas 10 veces (mínimo) con tip azul para ayudar a la resuspensión.
- 7) Incubar 10 minutos en hielo.
- 8) Centrifugar 10 minutos a 4 °C (máxima velocidad, 13000 rpm).
- 9) Remover el sobrenadante y resuspender en 1 mL EtOH 100% helado (tratar de resuspender bien el pellet lo más que se pueda usando pipeta). Para esto, primero dar vuelta el tubo y darle chicotazos hasta que el micelio del fondo del tubo se separe del mismo. Luego tomar un tip de p1000, quemar punta y resuspender. Luego tomar un tip de p1000 y resuspender (pipetear al menos 10 veces a partir de que se vea que no se obstruye la punta del tip con agregados de micelio).
- 10) Centrifugar 5 minutos a 4 °C (máxima velocidad, 13000 rpm).
- 11) Remover el sobrenadante y lavar el pellet 2 veces con 1 mL de acetona helada (nuevamente resuspender bien el pellet lo más que se pueda, cuanto más se resuspenda más proteína se va a obtener – Repetir el procedimiento del paso 9).
- 12) Remover el sobrenadante y secar el pellet al aire (poner a 60 °C hasta que se vean grietas en el pellet y el mismo tome un color blancuzco – demora unos 35-40 minutos).

Nota: Para verificar que no queden restos de TCA, se pueden agarrar un poco del sobrenadante restante y mezclarlo con de Buffer de Carga de ADN (como tiene Azul de Bromofenol, sirve como indicador de pH – es decir, si cambia a color amarillo es porque todavía queda TCA y hay que seguir lavando).

-
- 13) Disolver el pellet (nuevamente resuspender bien – repetir procedimiento de paso 9, sin darle chicotazos al tubo) en 400-500 μ L de Buffer de Extracción (agregar inhibidor de proteasas, diluído 1:500, antes de usar).
Nota: agregar el Buffer de Extracción, resuspender con tip de p1000 con punta quemada y luego usar p200. Intentar pipetear con tip de p200 (unas 30 veces, no pasa nada que se forme espuma por el SDS).
 - 14) Incubar 15 minutos en hielo.
 - 15) Centrifugar 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C (máxima velocidad).
 - 16) Tomar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo (el sobrenadante usualmente posee un color rojo claro o del color (claro) de la cepa en cuestión, si se torna amarillo agregar unas pocas gotas – 10-20 μ L - de 1 M Tris Base, este color amarillo es causado por trazas de TCA que disminuyen el pH).
 - 17) Eventualmente se puede recentrifugar el sobrenadante para remover cualquier debris.
 - 18) Cuantificar la concentración protéica por el método del BCA. Hacer como mínimo una dilución 1:10 para medir. Diluir también Buffer de Extracción 1:10 para usar como blanco para las muestras.

5.4.2.1 Composición Buffers:

(IMPORTANTE: preparar frescos, de lo contrario dejar a T ambiente).

Buffer de Precipitación:

- 50 mM Tris-HCl pH 8.0.
- 50 mM NaCl
- 12.5 % TCA

Buffer de Extracción:

- 100 mM Tris-HCl pH 8.0
- 50 mM NaCl
- 1% SDS
- 1 mM EDTA
- Inhibidores de proteasas SIGMA para hongos (aliquotar de a 50 μ L) dilución 1:500 (agregar inmediatamente antes de usar).

5.4.3 Cuantificación proteica por el método del BCA (kit marca Thermo)

- 1) Realizar diluciones 1:10 de los extractos proteicos y del Buffer de Extracción (blanco) en H₂O para hacer las medidas.
- 2) Realizar curva de calibración con BSA (0, 0.025, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5 y 2 mg/mL):

V (μL) BSA (5 mg/mL)	V (μL) H ₂ O mQ	[BSA] final (mg/mL)
40	60	2
30	70	1.5
20	80	1
15	85	0.750
20	180	0.5*
5	95	0.25
*V (μL) BSA (0.5 mg/mL)	V (μL) H ₂ O mQ	[BSA] final (mg/mL)
25	75	0.125
5	95	0.025

- 3) Cargar 25 μL de cada muestra por triplicado en placa de ELISA.
- 4) Agregar 200 μL Working Reagent (W.R):
 - Preparación W.R:
 - Cálculo de volumen necesario: (N° puntos curva calibración – 8 + 1 blanco - + N° muestras problema) x (N° replicas -3) x (Volumen W.R x muestra - 200 μL)
 - Preparación (preparar un poco más de lo necesario para no quedar justo): tomar el volumen calculado de W.R de Reactivo A y agregar la 50ava parte de Reactivo B (e.g. a 13 mL Reactivo A, agregar 0,260 mL de Reactivo B).
- 5) Agitar por 30 segundos en agitador orbital.
- 6) Incubar 30 minutos a 37 °C (poner tapa a la microplaca o cubrir con parafilm o film plástico).
- 7) Dejar que llegué a T ambiente.
- 8) Tomar las medidas de absorbancia a 562 nm en el lector de placas.

5.4.4 Western Blot

5.4.4.1 SDS-PAGE

- 1) Mezclar la alícuota de proteína con SDS Loading Buffer e incubar a 37 °C por 15 minutos.
- 2) Cargar 100 μg del extracto total y correr un gel SDS-PAGE al 10%.
- 3) Cargar 5 μL de Marcador de Peso Marcador Pre-teñido (de ser posible).
- 4) Dejar migrar hasta que el Azul de Bromofenol del Buffer de carga este por salir del gel.

5.4.4.2 Transferencia

- 1) Una vez finalizada el SDS-PAGE, medir las dimensiones del gel, hacer un corte de referencia, y pasarlo a un recipiente con Buffer de Transferencia (con SDS) frío.
- 2) Cortar un pedazo de membrana del tamaño del gel, con el corte de referencia y 12 papel Whatmann (6 si es grueso) un poco más grandes que la membrana. Agruparlos de a 6 (o 3 si es Whatmann grueso).
- 3) Sumergir todo en Buffer de Transferencia (con SDS) frío.
- 4) Armar el dispositivo de transferencia.
- 5) Transferir por 1 hora a 120 V.

5.4.4.3 Stripping

- 1) Una vez finalizada la transferencia, remojar unos segundos la membrana en H₂O mRo y ponerla en un recipiente con Stripping Buffer.
- 2) Incubar por 30 min a 55-60 °C en horno de hibridación (con leve agitación).
- 3) Remojar unos segundos la membrana en H₂O mRo y ponerla en un recipiente con Stripping Buffer.
- 4) Realizar 3 lavados de 5 minutos en TBST.
- 5) Dejar la membrana O.N en la heladera en 50 mL de Solución de Bloqueo.

5.4.4.4 Revelado

- 1) Incubar la membrana con el anticuerpo anti-GFP (Roche) (1:2500 en 3% BSA en TBST).
- 2) Realizar 6 lavados de 5 min con TBST
- 3) Incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP (HorseRadish Peroxidase) (diluído en Solución de Bloqueo).
- 4) Realizar 6 lavados de 5 min con TBST.
- 5) Revelar con kit de revelado por quimioluminiscencia (marca Invitrogen).

5.4.4.5 Soluciones

- SDS Loading Buffer (4X) Guardar a -20 °C:
- 250 mM Tris-HCl 6.8
- 12% SDS
- 40 % Glycerol
- 20 % β-mercaptoetanol (se le agrega a la alicuota).
- 0.02 % Azul de Bromofenol

Buffer de Transferencia (1 litro - dejar en heladera):

- Tris Base 3.02 g
- Glicina 14.42 g
- H₂O mRo c.s.p. 200 mL

Agregar 200 mL de Etanol y completar con H₂O mRo hasta 996,3 mL. Antes de usar, agregarle 3,7 mL de SDS 10%.

Stripping Buffer:

- 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 – 2,5 mL 1 M Tris-HCl pH 6.8 para 40 mL.
- 2% SDS – 8 mL 10% SDS para 40 mL.
- 100 mM β-Mercaptoetanol (se agrega en el momento) – 280 μL para 40 mL.

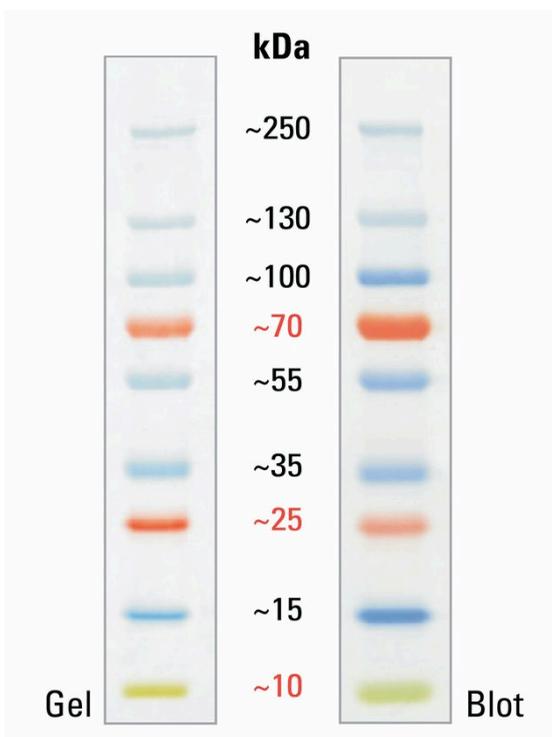
TBST (Buffer de Lavado):

- 20 mM Tris-HCl pH 7.5 – 20 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5 para 1 lt.
- 150 mM NaCl – 30 mL NaCl 5 M para 1 lt.
- 0.1% Tween 20 – 1 mL Tween 20 para 1 lt.

Solución de bloqueo:

- 5% leche descremada en polvo disuelta en TBST.

Marcador de peso molecular de proteínas pre-teñido utilizado (empresa Maestrogen)



5.4.5 Fusion-PCR

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se utilizó en todos los casos la polimerasa KAPA HiFi (Roche).

5.4.5.1 Primera ronda

Se utilizan 100 ng de ADN genómico proveniente de la cepa MVD10A en reacciones de PCR de 25 μ l (Tabla 3)

Tabla 2: Se muestran los reactivos utilizados con sus volúmenes empleados para la primera ronda de PCRs.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
BUFFER	5
DNTPS	0,75
PRIMERS*	0,75 c/u
ADN MOLDE (~500 NG)	5
POLIMERASA	0,5
H2O	12,75

* URE5-F y N279X-Rv para la amplificación de 5' *ureA* y URE3-R y N279X-Fw para la amplificación 3' de *ureA*. X representa el cambio aminoacídico.

Tabla 3: Se muestran los cebadores con sus respectivas secuencias. En el caso de los cebadores portadores de cada mutación (demarcado por las letras en rojo), en cada mutación se usa la secuencia determinante del aminoácido a cambiar.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'
URE5-F	GAAACCTGGAGCAGTCTGAAG
URE3-R	CCCGATTTCTGAGACAAGGA
N279A-RV	CAGTGCCGAAAGCACCGACGAGGTTGATGACCCAG
N279A-FW	ACCTCGTCGGTGCTTTCGGCACTGTCTTCCTGGAC
N279Q-RV	CAGTGCCGAACAAACCGACGAGGTTGATGACCCAG
N279Q-FW	ACCTCGTCGGTCTGTTCGGCACTGTCTTCCTGGAC

Las condiciones de reacción son las siguientes:

- Etapa inicial de 95°C por 3 minutos
- Desnaturalización a 98°C por 20 segundos
- *Annealing* a 61°C por 15 segundos
- Extension a 72°C por 2 minutos

25 ciclos, y una etapa final de 5 minutos

Tabla 4: Se muestra el largo esperado de cada fragmento del gen ureA

FRAGMENTO	LARGO ESPERADO (PARES DE BASES)
5'	2309
3'	4911

5.4.5.2 Segunda ronda

Para la generación del cassette se utilizan 25 ng de cada fragmento generado en reacciones de 25 µl. Se esperan fusiones de 7027 pb.

Tabla 5: Se muestran los reactivos utilizados con sus volúmenes empleados para la Fusion-PCR correspondiente a la mutación N279A

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
BUFFER	5
DNTPS	0,75
PRIMERS*	1 c/u
FRAGMENTO 5' (P1)	1 (~25 NG)
FRAGMENTO 3' (P4)	1,5 (~25 NG)
POLIMERASA	0,5
H2O	14,25

*Primers nested URE3-N y URE5-N

Tabla 6: Se muestran los reactivos utilizados con sus volúmenes empleados para la Fusion-PCR correspondiente a la mutación N279Q

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
BUFFER	5
DNTPS	0,75
PRIMERS*	1 c/u
FRAGMENTO 5' (P2)	1 (~25 NG)
FRAGMENTO 3' (P3)	1 (~25 NG)
POLIMERASA	0,5
H2O	14,75

*Primers nested URE3-N y URE5-N

Tabla 7: Se muestran los cebadores con sus respectivas secuencias.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'
URE5-N	GCACCGATGACAAGGGAGAT
URE3-N	ACCAATGGATCTGGCACTAAAC

Las condiciones de reacción son las siguientes:

- Etapa inicial de 95°C por 3 minutos
- Desnaturalización a 98°C por 20 segundos

- *Annealing* a 85°C por 15 segundos
- Extension a 72°C por 7 minutos

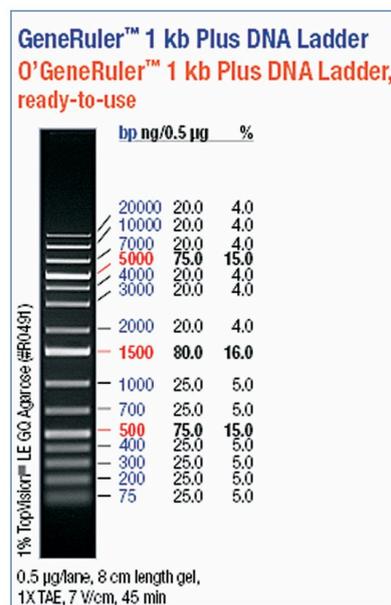
Se hacen 10 ciclos con el fin de que los fragmentos se fusionen. Luego:

- Desnaturalización a 98°C por 20 segundos
- *Annealing* a 85°C por 15 segundos
- Extensión a 72°C por 7 minutos, aumentando 20 segundos en cada ciclo

Se hacen 15 ciclos con el fin de amplificar las moléculas.

5.4.6 Análisis electroforético de ADN

Los ADNs se analizan por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8)) con 2 µl de intercalante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific™). Las muestras de ADN se cargan en el gel con ayuda de un buffer de carga 6X (50 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 0.002 % xylencianol). Como referencia de peso molecular se empleó el marcador de peso molecular Thermo Scientific™ Estándar de ADN O'GeneRuler 1 kb Plus. Las corridas se realizan aplicando un voltaje de 9 V/cm y el ADN se visualiza por exposición a luz UV de 302 nm.



5.4.7 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Tanto para la purificación directa, como la extracción y purificación de las bandas de ADN contenidas en los geles de agarosa se empleó el kit de purificación “GeneJET Gel Extraction Kit” de la empresa Thermo Scientific™.

5.4.8 Determinación del número de copias del gen mediante qPCR

Para los ensayos de qPCR se utilizan 25 ng/μl de ADN genómico en un volumen total de 10 μl.

Tabla 8: Se muestran los reactivos utilizados con sus volúmenes empleados para la qPCR

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
MASTERMIX (2X)	5
PRIMERS	0,4 c/u
ADN MOLDE	2
H2O	2,2

Tabla 9: Se muestran los cebadores con sus respectivas secuencias.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'
UREA_QPCR_3-F	GGACAACGGCTACTACAACA
UREA_QPCR_3-R	GAATAGCGAACCAGCAGAGA

5.4.9 Microscopía de fluorescencia

Las muestras fueron incubadas directamente en *cubreobjetos* estériles protegidos de la luz en medio mínimo suplementado con prolina (5 mM) como fuente de nitrógeno y los suplementos necesarios. Se incubó a 25°C por 14-16 horas. Las muestras fueron observadas y fotografiadas con el microscopio invertido Olympus CKX31 perteneciente a la Plataforma de Microscopía del Institut Pasteur de Montevideo con un filtro U-MNIBA3. El microscopio está equipado con una cámara Hamamatsu Orca Er y usa el software *Micro-Manager* (<https://micro-manager.org/>) para procesamiento de imágenes.

5.4.10 Extracción de ADN genómico

- Se inoculan 200 mL de MM líquido (con los suplementos nutricionales necesarios), con una suspensión de esporas generada a partir de una placa de conidias de la cepa en cuestión en 7.5 mL de 0.01% Tween 80.
- Se incuba "Overnight" (O.N) a 37 °C a 140 r.p.m para luego filtrar el cultivo sobre blutex, lavando el micelio con agua estéril y secándolo bien entre hojas de papel.
- El micelio obtenido se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero hasta obtener un polvo blanco.
- Se agrega 800 μL de solución de extracción de ADN por cada 200 mg de micelio molido y se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente.

- El ADN se extrae primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 – se agrega 400 µL de fenol y 400 µL de cloroformo isoamílico). Se vortexea bien y se centrifuga a 11.600 g por 10 minutos a T ambiente.
- Se toma la fase acuosa (unos 600 µL) y se le agrega un mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se vortexea bien y se centrifuga a 11.600g por 10 minutos a T ambiente.
- Se toma la fase acuosa (unos 400 µL) y se precipita con dos volúmenes de etanol 100% en presencia de 0.3 M de Acetato de Sodio (AcNa).
- Se incuba por 30-60 min a -20°C y se centrifuga por 10 minutos a 11.600g.
- Se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava 2 veces con 1 mL EtOH 70% (se agrega el EtOH 70%, se invierte el tubo, se centrifuga a 11.600 g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante).
- Se seca el precipitado debajo de una lampara por 10 minutos y se resuspende en 50-100 µL de buffer Tris-EDTA 10-1 (suplementado con RNAsa a una concentración final de 10 µg/mL).
- Finalmente se incuba por 1 hora en baño de agua a 37 °C.

5.4.10.1 Soluciones

Solución de extracción:

- 0.2 M trisHCl pH 7.5, 1 % SDS, 1 mM EDTA.
- Buffer Tris-EDTA (TE) 10-1: 10 mM tris.HCl, 1 mM EDTA pH 8.

5.4.11 Secuenciado de mutantes

Para la secuenciación de los mutantes, se realizó una PCR para amplificar la secuencia genómica del gen *ureA*:

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
BUFFER	5
DNTPS	0,75
PRIMERS*	0,75 c/u
ADN GENÓMICO (100 NG)	3
POLIMERASA	0,5
H2O	14,25

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'
FUREA2	GTTCTTCGGTTATCCAAAATGG
UREA-RIGHT	GGTCGCCACCCTGGTATAA

Las condiciones de reacción son las siguientes:

- Etapa inicial de 95°C por 2 minutos
- Desnaturalización a 98°C por 20 segundos
- *Annealing* a 61°C por 15 segundos
- Extension a 72°C por 5 minutos

30 ciclos, y una etapa final de 5 minutos a 72°C.

Se espera un amplicón de 4950 pb.

Una vez obtenido el amplicón de interés, este fue purificado por kit (secciónx.x.x), y se envió a la empresa MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

6 Anexo

6.1 Construcción de

5'UTR_ureA::ureAN279A/N279Q::gfp::pyrGAF::3'UTR_ureA

AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGCCTCGCTACCGGCGGGAA
TACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCTATCGACTTAATCCCGTCATGGATGTCAAGGAAACGC
TTGGATTGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATATATGCCTTGAATCTCATTTCGACACTAGTTAACTCACAAAACCTGGAGCAGTC
GAAGATAGTATCACACCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCACTTGTCTGGTCCATGTGGTCGATSCACCGATGACAAGGG
AGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTTCGTACCCGGGTCCTGGTTTGTGGGAATGTTAAC
GATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTCTTCGCGTATGGCATATTTCGGCGTATTCTATGGGCTCTTGAG
TCCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTCTCTAACTGCCCGCAGAACTGGCGAAAACCTCATTGCAAGAACCTTTTGTCCACCATTTGTA
TGCTTACCTGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCTCCTACGGTCTACTTGGGATTAGGACGATATTCCTCCC
TACTTCGTAGACTAACTCCAGTGAAGCATTGGGGGGAGAGGTTTCGATGTGTGGATTATAATACTCTTGGGCGAAGAGACT
GTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTCAAAACGGCTTGGAGTTGATAAGTGTGAATATATTCCTGTGCCAG
AGGAGCCGTAGTAACCCTGATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCACGTAGTCGGACAGTTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGG
AGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATCTGCAGTCAAGTTATCAGTTCTCGAGAATGACCATGG
CCCTTCTCTTCAATGCGTGTTCGGCCATGGCCGGCCCGTCCCCAGTTCAACTGTCCGGCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCG
TCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCCTGATAAGCCTACAATTTTCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCATCCACCAGGATAACG
AAACATCCTGCCAGTAAGGTTAACTCGCTGCTCCAGGCCATTCTTTTCAGAGACCCTGAGTACGAAGTGAAGGAATGATGGA
GAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTCAATCCTTTATTACGAAACATGGTGCCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGGGACAGCTC
TCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTTATCATTGCATCGCCAATAATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAA
GGTTGACGCAGCGGGATCGGAGATTTAAGTCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACTTAA
AGATCTGGAACCTGCAGACACCAGACTGCCTGAAATTGTAACGAAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTAGTTCT
CCACTGGTTCTTCGGTTATCCAAAATGTTGCGGTTATAGCTGCCCCCGATGAAGCCGGGGTAGAGACCGTTACGTTCACTGC
TCCCCTCACCAAGGGTTTGGGTACGGGATCATCATCGGGCTCGGGTTCGCCTTTGCCCTGGTCATGATCTTCATCACCTGGT
CCCTAAAGAGGTAAGTTTTGTGACAGATTGGTTTTGAGCAGGACTAACGGTCTAGGATCAACATGAGATTATCAGCTCTGAG
ATGTTCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTGTGCTGAGCAGTTGGACCTGGGCAGCTACTCT
GCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGGCCGTTCTTCTATGCATCGGGTTGGTCTTCACCCCGGTATG
ACACGAAGGATATACTGACAGTTTGCAGGCGCCACCCTCAGATCATCTTGTGTTGCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACG
CGCGCCTAACGCACACACATTCTGGAAGCCATCCGTGCCCGTTACGGTACCGTCTGACATCTCGTCTTCATCGTTTCTGCC
TGATGACCAACATCCTCGTTACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGCGTCCAGTTGTT
GCAGCCTGCTTCTCCTCCCAATCGGTGTGGTTCTGTACACCCTTTTCGGAGGCATTAAGCAACATTCATCACCGACTATAT
GCACACTGTTGTCAATTGTGCTGATCATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTACGCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCCGCA
AAGTCTATGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCGGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCC
AAAGATGGCGGTATCTTCTGGGTCACTCAACCTCGTGGTTACTTCGGCACTGTCTTCTGACAACGGCTACTACAACAAGGC
CATCGCCGCGCACCCAGTCCACGCTTTCCTGGATATGTATCGGCGGTCTCTGCTGGTTGCTATTCCTGGCTCTGCGCGA
CAACGATGGGTCTCTCTGCACTTGCCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCTCGTCTTCCC
TTTGATCTGTGCAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCCTTATGATCTTTATGGCCGTGACCTCTGCTTCTC
GGCCAGCTCATCGCCGTGCTCTCGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCCTGCCGCAAAGGGCAAACGCC
TCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGTCTTCACTACGCTGGTATC
GGTATGGGCTATCTCTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTCAGCCGTGTTCCCGGGCGCCATGACCCCTCGTCTGGAAGGG
GCAGAACTGGATCGCGGACCCGCTCTCCAGTTTTGGGCTCGCAATGTCCCTGGTTGCGTGGCTTGTTACAACAAAGACAG
AGTATGGCGTCTTACCCTGCAACCACAGGAGCAAACCTACCCCATGCTAGCGGGCAACGTCGCCGCCCTTCTCAGCCCTGTC
GTCTTCTCGCCAGTCTTGACATACTCTTCGGCCCTCAGAATTACGACTACGAATCCATGCGCGCCATCCGCAAAGTCGATGA
CTCGGATGTGCGCGGCGGCGCACGTCGACCTCGAGCTCATTCCCGGCGCTTCCAATACAACTCGTCCCTTTCACAGCAAC
AGCAAGAGGAAGAGGAAATAAGAAAACCTCAACAAAGCCGATTTATTTCCCGCTGTCTCACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTC
TTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTTCTCAGCAAGAAGTTCTTTCACAGGCTGGGTTGTGTGGGCAT
CATCTGGCTCTTTGGGACTGCGTTCGGGGTGAATCTATTCCCGCTCTGGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAGGGTTGTTAAGC
TTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAGCAGTGTCTGTTAGGCCAGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGG
TCTGGTGTGTTACACCGAGCGAGAAGATTGTTGCAAAAAGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCAGTAAAGGAGAAGA
ACTTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGTAATTAGATGGTGAATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTG

AAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAGTTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTG
 ACTACTTTTACCTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCC
 TGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAAGACGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAAGTCAAAGTTTGAGGGAG
 ACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAAC
 TACAACCTCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGA
 AGACGGCGGCGTGAACCTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCAT
 ACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTCTTCTGAGTTTGTAAACAGCTGCT
 GGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA **TAA**ACCGGTCGCCTCAAACAATGCTCTTACCCTCTTCGCGGGTCTGAAA
 TACCCTCACCTGGCAACAGCAATTGGCGCTTCATGGCTGTTTTTCCGATCTCTCTACTTGTACGGCTATGTGTACTCGGGTAA
 GCCACAAGGCAAGGGCAGATTGCTGGGAGGTTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTGAGTGTGTTTTGGTGTG
 CCAAAGACATGATCTCTTACTGAGAGTTATTCTGTGTCTGACGAAATATGTTGTGTATATATATATATGTACGTTAAAAGTTC
 CGTGGAGTTACCAGTGATTGACCAATGTTTTATCTTCTACAGTTCTGCCTGTCTACCCATTCTAGCTGTACTGACTACAGA
 ATAGTTTAATTGTGGTTGACCCACAGTCGGAGGCGGAGGAATACAGCACCGATGTGGCCTGTCTCCATCCAGATTGGCACGC
 AATTTTTACACGCGGAAAAGATCGAGATAGAGTACGACTTTAAATTTAGTCCCCGGCGGCTTCTATTTTTAGAATATTTGAGAT
 TTGATTCTCAAGCAATTGATTTGGTTGGGTACCCTCAATTGGATAATATACCTCATTGCTCGGCTACTTCAACTCATCAATC
 ACCGTCATACCCCGCATATAACCCTCCATTCCACGATGTCTGCAAGTCGCAATTGACTTACGGTGTCTCGAGCCAGCAAGCA
 CCCAATCCTCTGGCAAAGAGACTTTTTGAGATTGCCGAAGCAAAGAAGACAAACGTTACCGTCTCTGCTGATGTGACGACAA
 CCGGAGAACTCCTGGACCTCGCTGACCGTACGGAAGCTGTTGGATCCAATACATATGCCGCTAGCAATGGACTAATCAACTT
 TTGATGATACAGGTCTCGGTCCCTACATCGCCGTCAAGACACACATCGACATCCTCACCGATTTACAGCGTCGACACTATC
 AATGGCCTGAATGTGCTGGCTCAAAGCACAACTTTTTGATCTTCGAGGACCGCAAATTCATCGACATCGGCAATACCGTCCA
 GAAGCAATACCACGGCGGTGCTCTGAGGATCTCCGAATGGGCCACATTATCAACTGCAGCGTTCTCCCTGGCGAGGGCATCG
 TCGAGGCTCTGGCCAGACCGCATCTGCGCAAGACTTCCCCTATGGTCTGAGAGAGGACTGTTGGTCTTGGCAGAGATGACC
 TCCAAAGGATCGCTGGCTACGGGCGAGTATACCAAGGCATCGGTTGACTACGCTCGCAAATACAAGAACTTCGTTATGGGTTT
 CGTGTGACGCGGGCCCTGACGGAAGTGCAGTCGGATGTGTCTTCAGCCTCGGAGGATGAAGATTTCTGTTCTTCACGACGG
 GTGTGAACCTCTCTTCAAAGGAGATAAGCTTGGACAGCAATACCAGACTCCTGCATCGGCTATTGGACGCGGTGCCGACTTT
 ATCATCGCCGGTTCGAGGCATCTACGCTGCTCCGACCCGGTTGAAGCTGCACAGCGGTACCAGAAAAGGCTGGGAAGCTTA
 TATGGCCAGAGTATGCGGCAAGTCATGATTTCTTCTGGAGCAAAGTGTAGTGCCAGTACGAGTGTGTGGAGGAAGGCTGC
 ATACATTGTGCTGTCATTAAACGATGAGCTCGTCCGTATTGGCCCCTGTAATGCCATGTTTTCCGCCCCCAATCGTCAAGGT
 TTTCCCTTTGTTAGATTCCCTACCAGTCATCTAGCAAGTGAGGTAAGCTTTGCCAGAAACGCCAAGGCTTTATCTATGTAGTCG
 ATAAGCAAAGTGGACTGATAGCTTAATATGGAAGGTCCCTCAGGGACAAGTCGACCTGTGCAGAAGAGATAACAGCTTGGCAT
 CACGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACTCATATATCTTGCCTGTTGTGTGTTTACGCTAGCTAGATTCAATTTATGTTTTGCGTTT
 GATTCATTTATACCCCACTCGTTACACATGTACCAAGTTTTTATACCAGGGTGGCGACCAGCGTTTATGATAAGATAGCTTAT
 ATAGAATATGGCTATTTTCAATTAAGCATTATAATTCATTCTTACGGACCCTAGCTGAAGCAGTTATGTGCTCCAAGCCGTCATT
 AACTTTATAGAGCGAAATATAGAATTACAACTGGAAAGACAAGAGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATA
 GAACAGTAACTTAGGTATCGTCATCAATCTGAGAGTAACTCCAGTCTTTTCGAGGACCTGACGAACACTGCCCTCAGAGGCATT
 TGCCATGAGCGCATCACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCCGACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGC
 TGCTGCGGGGTTTTGCTGCTGCTGATACCCCCAAAGTATGCCTGCGGCGGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGG
 CCGAGTGTCTGGGTTAATATCGGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTAAGTGAAGCAGTGGAT
 CAGATGAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCGCAAGTCTGGGTAAATCGGCATGTGTAGCATGTAACCTCC
 TTGTACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTGAGTTCCCTTTTCTTCCGTACAATACTGCCCTTTAGCA
 AAGGCAGGATAGTGCCATAACAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTATACATGCGTTAGCCCCAGGCGTAGTTAGTTAAC
 TCAGGACAACATAACCATCGTGTACACACCGTCCATTCCAATGGTTGCCTGTACGGAGTTTAGTGCCAGATCCATTGGTAACT
 GTTGAACAGCAGCCACGCCGTG **TCCTTGTCTCAGAAATCGG**ACTA

6.1.1.1 Referencias

- Rojo: 5' y 3' *ureA*
- Negro: *ureA* codificante
- Azul: intrones *ureA*
- Verde: *gfp*
- Naranja: *pyrGAF*

-
- **Con fondo violeta:** codón que codifica para la N279 (AAC). Mutado a GCT para mutación N279A y a CAG para la mutación N279Q.
 - **Subrayado:** N279X-Fw (5' ->3'): ACCTCGTCGGTXXXTTCGGCACTGTCTTCCTGGAC
 - **Con fondo amarillo:** N279X-Rv (5' ->3'):
CAGTGCCGAAXXXACCGACGAGGTTGATGACCCAG
 - **Con fondo azul:** URE5-F (5' ->3'): GAAACCTGGAGCAGTCGAAG
 - **Con fondo verde:** URE3-R (5' ->3'): CCCGATTCTGAGACAAGGA
 - **Con fondo gris:** URE3-N
 - **Con fondo rosado:** URE5-N

7 Bibliografía

- Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S. & Ramon, A., 2010. UreA, the major urea/Hp symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, Issue 47, pp. 1023-1033.
- Adams, T., Wieser, J. & Yu, J., 1998. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1(62), pp. 35-54.
- Apostolaki, A. y otros, 2009. AgtA, the Dicarboxylic Amino Acid Transporter of *Aspergillus nidulans*, Is Concertedly Down-Regulated by Exquisite Sensitivity to Nitrogen Metabolite Repression and Ammonium-Elicited Endocytosis. *Eukariotic Cell*, 8(3), pp. 339-352.
- Arst, H. & Cove, D., 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, Volumen 126, pp. 111-141.
- B, A., 2008. *Molecular biology of the cell*. Sexta ed. Nueva York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P. & Turner, G., 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and biophysical research communications*, 112(1), pp. 284-289.
- Barthelmess, I. B. & Kolanus, J., 1990. The range of amino acids whose limitation activates general amino-acid control in *Neurospora crassa*. *Gebet. Res*, Issue 55, pp. 7-12.
- Caddick, M. X., 1992. Characterization of a major *Aspergillus* regulatory gene, *areA*. En: U. Stahl & P. Tudzynski, edits. *Molecular biology of Filamentous Fungi*. s.l.:Weinheim: VCH Press, pp. 141-152.
- Caddick, M. X. y otros, 2006. Opposing signals differentially regulate transcript stability in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*, Issue 62, pp. 509-519.
- Chalfie, M. y otros, 1994. Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. *Science*, Issue 27, pp. 802-805.
- Chiang, C., 2001. Green fluorescent protein rendered susceptible to proteolysis: positions for protease-sensitive. *Biochem Biophys*, 394(2), pp. 229-35.
- Diallinas, G., 2008. The *Aspergilli* : genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. En: G. H. Holdman & S. A. Osmani, edits. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC, pp. 301-320.
- Drew, D. & Boudker, O., 2016. Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem*, Issue 85, pp. 543-572.
- Edgar, R., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 113(5), pp. 1471-2105.

-
- ElBerry, H. M. y otros, 1993. Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, Issue 175, pp. 4688-4698.
- Faham, S., 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar. *Science*, 5890(321), pp. 810-4.
- Fernández-Ábalos, J. y otros, 2002. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 27(1), pp. 121-130.
- Forrest, L., Kramer, R. & Ziegler, C., 2011. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1807(2), pp. 167-188.
- Fraser, J. A., Davis, M. A. & Hynes, M. J., 2001. The formamidase gene of *Aspergillus nidulans*: regulation by nitrogen metabolite repression and transcriptional interference by an overlapping upstream gene. *Genetics*, Issue 157, pp. 119-131.
- Fu, Y. H. & Marzluf, G. A., 1987. Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol*, Issue 7, pp. 1691-1696.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E. & Cuomo, C., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative. *Nature*, Issue 438, pp. 1105-1115.
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A. & Diallinas, G., 2009. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Molecular Microbiology*, 75(1), pp. 246-260.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, J. K. & Williams, P. M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10), pp. 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology*, Issue 11, pp. 1026-1030.
- Hynes, M. J., 1975. Studies on the Role of the *areA* Gene in the Regulation of Nitrogen Catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(3), pp. 301-304.
- Hynes, M. & Pateman, J., 1970. The Use of Amides as Nitrogen Sources by *Aspergillus nidulans*. *Microbiology Society*, 63(3).
- Kirk, P., Cannon, P., David, J. & Stalpers, J., 2001. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 9 ed. s.l.:CABI Publishing.
- Kryptou, E. & Diallinas, G., 2014. Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, Volumen 63, pp. 1-8.

Kudla, B. y otros, 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J*, Volumen 9, pp. 1355-1364.

Langdon, T. y otros, 1995. Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression. *Mol. Microbiol.*, Issue 17, pp. 877-888.

Liu, L. H., Ludewig, U., Frommer, W. B. & von Wiren, N., 2003. AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. *Plant Cell*, Issue 15, pp. 790-800.

Livak, K. & Schmittgen, T., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Elsevier*, 25(4), pp. 402-408.

Mackay, E. & Pateman, J., 1982. The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet*, pp. 763-776.

Magasanik, B., 2005. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, Issue 102, pp. 16537-16538.

Mahmood, T. & Yang, P., 2012. Western Blot: Technique, Theory and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*, Issue 9, pp. 429-424.

Marzluf, G. A., 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Issue 61, pp. 17-32.

McCully, K. & Forbes, E., 1965. The use of p-fluorophenylalanine with 'master strains' of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6(3), pp. 352-359.

McDonald, M., Smith, C. & Walsh, P., 2006. The physiology and evolution of urea transport in fishes. *The Journal of Membrane Biology*, Volumen 212, pp. 93-107.

Merigout, P. y otros, 2008. Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.*, Issue 147, pp. 1225-1238.

Michielse, C. B. y otros, 2014. The interplay between the GATA transcription factors *AreA*, the global nitrogen regulator and *AreB* in *Fusarium fujikuroi*. *Mol. Microbiol.*, Issue 91, pp. 472-493.

Morel, M. y otros, 2008. Characterization and regulation of PiDur3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal genet. Biol.*, Issue 45, pp. 912-921.

Morozov, I. Y., Galbis-Martinex, M., Jones, M. G. & Caddick, M. X., 2000. A defined sequence within the 3' UTR of the *areA* transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation. *Mol. Microbiol.*, Issue 37, pp. 1248-1257.

-
- Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G. & Caddick, M. X., 2001. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Mol. Microbiol*, Issue 42, pp. 269-277.
- Muro-Pastor, M. I., Strauss, J., Ramon, A. & Scazzocchio, C., 2004. A paradoxical mutant GATA factor. *Eukaryot. Cell*, Issue 3, pp. 393-405.
- Narendja, F., Goller, S. P., Wolschuk, M. & Strauss, J., 2002. Nitrate and the GATA factor *AreA* are necessary for in vivo binding of *NirA*, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*, Issue 44, pp. 573-583.
- Navarathna, D. y otros, 2011. *Dur3* is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase *Dur1,2*. *Microbiology*, Volumen 157, pp. 270-279.
- Navarathna, D. H. y otros, 2011. *Dur3* is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase. *Microbiology*, Issue 157, pp. 270-279.
- Nayak, T. y otros, 2006. A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), pp. 1557-1566.
- Nazarenko, I. A., Bhatnagar, S. K. & Hohman, R. J., 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer.. *Nucleic Acids Res*,, 25(12), pp. 2516-2521.
- Pateman, J. A., Dunn, E. & Mackay, E. M., 1982. Urea and thiourea transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Genet*, Issue 20, pp. 777-790.
- Platt, A. y otros, 1996. Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor *AREA* and the 3' untranslated region of its mRNA. *EMBO J*, Issue 15, pp. 2791-2801.
- Pontecorvo, G. & Kafer, E., 1958. Genetic Analysis Based on Mitotic Recombination. *Advances in Genetics*, Volumen 9, pp. 71-104.
- Pontecorvo, G. y otros, 1953. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, Volumen 5, pp. 141-238.
- Roon, R. J. & Levenberg, B., 1968. An adenosine triphosphate-dependent, avidin-sensitive. *J. Biol. Chem.*, pp. 243-5213.
- Sanguinetti, M. & Amillis, S., 2014. Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* *UreA*, a member of the subfamily of urea/H⁺ transporters in fungi and plants. *Open Biology*, 4(140070).
- Scazzocchio, 2019. *Aspergillus* : A Multifaceted Genus. *Encyclopedia of Microbiology*, Issue 4, pp. 262-292.

-
- Shi, Y., 2013. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys*, Issue 42, pp. 51-72.
- Szewczyk, E. y otros, 2007. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), pp. 3111-3120.
- Tamura, K. y otros, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, Volumen 28, pp. 2731-2739.
- Todd, R. B. y otros, 2005. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot. Cell*, Issue 4, pp. 1646-1653.
- 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 Genetics and Biology*, 30(2), pp. 105-113.
- Vangelatos, I. e. a., 2009. Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. *Mol Membr Biol*, 5(26), pp. 356-370.
- Wang, W. H., 2012. Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization. *Rev Biophys*, Issue 42, pp. 51-72.
- Watanabe, S., 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature*, 7326(468), pp. 988-991.
- Wiame, J. M., Grenson, M. & Arst, H. N., 1985. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.*, Issue 26, pp. 1-88.
- 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*, Issue 7, pp. 917-925.
- Zanin, L., 2015. The Urease Inhibitor NBPT Negatively Sffects DUR3-mediated Uptaje and Assimilation of Urea in Maize Roots. *Front Plant Sci*, Volumen 6, p. 1007.
- Zanin, L. y otros, 2014. Isolation and functional characterization of a high affinity urea transporter from roots of *Zea mays*. *BMC Plant Biology*, 222(14).