



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

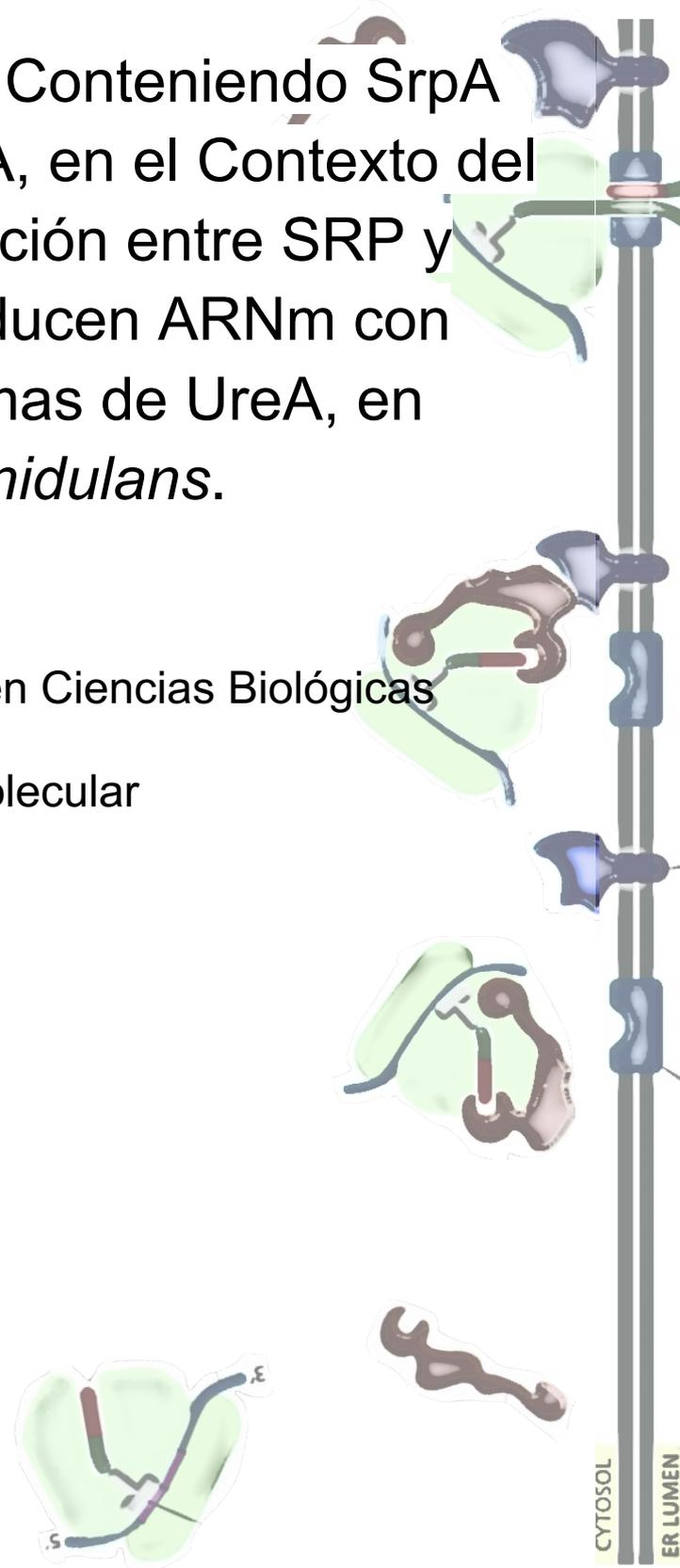


FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Generación de Cepas Conteniendo SrpA con una Marca triple-HA, en el Contexto del Estudio de la Interacción entre SRP y Ribosomas que Traducen ARNm con Mutaciones Sinónimas de UreA, en *Aspergillus nidulans*.

Tesina de Grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Sección Bioquímica, Biología Molecular
Bach. Ania Gómez
Orientadora: Dra. Ana Ramón



Resumen

El complejo ribonucleoproteico Signal Recognition Particle (**SRP**), está implicado en el reconocimiento y localización hacia la membrana del retículo endoplásmico (**RE**), del complejo Ribosoma-cadena polipeptídica naciente (**RCN**), para proteínas que son destinadas a terminar su síntesis allí. SRP reconocería una secuencia señal (**SS**) en el polipéptido naciente, a la vez que interactuaría con la subunidad mayor del ribosoma. Este mecanismo de localización, se encontraría muy conservado desde bacterias hasta animales, variando principalmente, en la composición proteica de SRP. La subunidad SRP54 en eucariotas y su homólogo en bacterias (Ffh), es la proteína más conservada del complejo: consta de un sitio de unión a ARN, un dominio con actividad GTPasa y estaría fuertemente implicada en el reconocimiento de las SS en los polipéptidos nacientes y en su translocación a través de la membrana. Muchas de las proteínas que contienen una SS, son proteínas de membrana que, por su carácter hidrofóbico, son incapaces de plegarse correctamente en el citosol, donde potencialmente formarían agregados tóxicos. Su síntesis, entonces, tendría lugar a la vez que son insertadas de manera cotraduccional en la membrana del ER.

El transportador de urea en *Aspergillus nidulans* (**UreA**), es una proteína politópica de membrana, que media el transporte del compuesto, el cual puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por el hongo. En el ARNm que codifica para esta proteína, se han identificado un par de codones consecutivos no-óptimos, ubicados en las posiciones 24 y 25. Estos se encontrarían muy conservados en otras 7 especies del género. En cepas mutantes en las que se realiza una sustitución por los sinónimos óptimos, se observan deficiencias en el transporte a 37°C de urea y su análogo tóxico, 2-tiourea (**2-TU**); por tanto, la cepa crece con dificultad en urea como única fuente de nitrógeno y es parcialmente resistente a la 2-TU a esta temperatura. Esta deficiencia es, al menos parcialmente, restaurada cuando la misma cepa crece a 25°C.

Se ha documentado que en etapas muy tempranas de la traducción de proteínas de membrana, se daría una pausa fundamental para la eficiencia en el mecanismo de SRP. Esto llevó a proponer que la presencia de los codones no-óptimos en el ARNm para UreA, pudieran jugar un papel preponderante en dicha pausa en los inicios de la traducción y en la interacción de SRP con el RCN. Esta pausa sería eliminada en mutantes que contuvieran la sustitución por sus sinónimos óptimos. Esto podría implicar, entonces, que la deficiencia en el transporte de urea y análogos en dichos mutantes, se deba a la falta de biosíntesis de la proteína UreA, por una alteración de las etapas iniciales de la traducción.

En pos de poner a prueba esta hipótesis, se ha planteado realizar ensayos de co-inmuprecipitación de SRP y los RCNs asociados que estén traduciendo los mensajeros de UreA, en cepas salvajes y portando las mutaciones sinónimas (UreA₂₄₂₅). Esto sería modo de observar la cantidad de ARNm para UreA, asociado a los complejos RCN-SRP. Este trabajo se desarrolló en dicho contexto y consistió en generar cepas de *A. nidulans* que contuvieran una triple marca HA conjugada a la subunidad SrpA (ortólogo de SRP54) de SRP, para ser utilizada en ensayos de inmunoprecipitación.

Para ello se llevó a cabo la generación de una construcción genómica portando tres repetidos del tag HA, seguidos de la secuencia codificante para SrpA. Esta fue utilizada para la transformación de cepas salvajes y UreA₂₄₂₅. Los análisis de los transformantes, develaron que la misma se habría dado de forma exitosa en los transformantes UreA₂₄₂₅, pero no en la cepa salvaje. De todas formas, posteriores análisis son necesarios para corroborar la presencia de los 3 repetidos en los transformantes identificados.

Índice

1. Introducción
 - 1.1. Membranas Biológicas
 - 1.2. Proteínas de Membranas
 - 1.3. Traducción de Proteínas de Membrana
 - 1.3.1. La Ruta Signal Recognition Particle - Direccionamiento Co-Traduccional
 - 1.3.2. La Secuencia Señal (SS)
 - 1.4. Control Cinético de la Traducción en la Ruta SRP
 - 1.5. Uso de Codones
 - 1.6. *Aspergillus nidulans* – Organismo Modelo
 - 1.7. UreA -Transportador de urea en *A. nidulans*
 - 1.8. Posible Rol de SRP en la Traducción de UreA
 - 1.9. Tag-HA
2. Hipótesis
3. **Objetivo General**
 - 2.1. Objetivos Específicos
4. Materiales y Métodos
 - 4.1. Cepas Utilizadas
 - 4.2. Medios de Cultivo
 - 4.3. Western Blot
 - 4.4. Diseño de Cebadores
 - 3.4.1 Fusion-PCR
 - 3.4.2 PCR Colonia
 - 4.5. Extracción de ácidos nucleicos
 - 4.6. Amplificación por PCR
 - 4.6.1. Fusion-PCR
 - 4.6.2. PCR para Secuenciación
 - 4.6.3. PCR Colonia
 - 4.7. Purificación ADN
 - 4.8. Visualización ADN
 - 4.9. Cuantificación ADN
 - 4.10. Transformación
 - 4.10.1. Purificación de Transformantes
 - 4.10.2. Placas Fenotipo
 - 4.11. Secuenciación
 - 4.12. Análisis de Secuencias
5. Resultados y Discusión
 - 5.1. Western Blot
 - 5.2. Fusion-PCR
 - 5.3. Transformación
 - 5.4. Secuenciación
 - 5.5. PCR Colonia
6. Conclusiones y Perspectivas
7. Referencias
8. **Anexo**

1. Introducción

1.1 Membranas Biológicas

La separación del ambiente interno del externo habría sido uno de los requisitos primordiales que permitiera cierta independencia y autonomía de las condiciones que primaran en el entorno, y dar paso así a la formación de la vida tal como la conocemos. Las membranas biológicas cumplen precisamente ese fundamental rol de frontera y en todos los reinos de la vida, si se excluyen a los virus, mantienen esencialmente los mismos componentes: una bi o mono capa lipídica y una batería de proteínas interactuando con ésta. La bi/mono capa, forma una barrera impermeable a compuestos hidrofílicos, que brinda además protección mecánica, garantizando, en cierta medida, la estructura general de la célula y el mantenimiento de ciertos componentes a un lado y a otro de la membrana. Los tres tipos de lípidos más frecuentemente encontrados en las biomembranas, son fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides (siendo los fosfoglicéridos los más abundantes). Los dos primeros, poseen propiedades anfipáticas (es decir que existen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas dentro de la misma molécula), lo que les permite asociarse entre sí, de forma tal que sus colas hidrofóbicas se agrupan, dejando expuestas las cabezas solubles en agua hacia el interior y exterior de la célula. Es interesante notar que este elemento tan fundamental y casi universal de las células, no se ensambla por medio de enlaces covalentes, sino que son fuerzas débiles (de Van der Waals) las que mantienen los lípidos unidos entre sí. Otro detalle, no menor, es que la composición química de los distintos lípidos anfipáticos que pueden encontrarse en las membranas biológicas, es de una naturaleza muy variada. Notablemente, la clase de molécula que componga las colas hidrofóbicas (ácidos grasos, isoprenoides), el largo y el número de insaturaciones en las mismas, la carga eléctrica neta de los grupos hidrofílicos, son algunas de las características principales que dictaminan las propiedades que mostrarán las moléculas y las interacciones que establecerán entre sí y con otras. El siguiente tipo de lípidos que pueden encontrarse en las membranas, son los esteroides; a diferencia de lo descrito anteriormente, son moléculas netamente hidrofóbicas, incapaces de asociarse por sí solos en capas, por lo que se encuentran inmersas entre las colas hidrofóbicas de los fosfoglicéridos y/o esfingolípidos. Las diferencias en la naturaleza química que pueden exhibir los distintos lípidos, la presencia de unos u otros y la proporción relativa en la que se encuentren, definirá ciertas propiedades de la membrana, como ser la fluidez, la flexibilidad, la estabilidad y la organización general. En organismos eucariotas, se suma además la existencia de un sistema de membranas internas, que delimitan a los organelos y en dónde es también la composición lipídica un determinante de las características que exhibirá y, junto con el acervo de proteínas que estén embebidas allí, lo definirán según su función.

Para un organismo unicelular, la composición tanto lipídica como proteica de su membrana plasmática, determinará qué ambientes podrá habitar y qué tipo de relaciones podrá establecer con éste, de acuerdo a que su composición le confiera la capacidad, o no, de obtener y metabolizar los compuestos necesarios para su crecimiento a partir de aquellos que se encuentren disponibles, en

las condiciones de temperatura, pH, salinidad y disponibilidad de agua que haya en el ambiente (y de ser eficazmente competitivo en dichas condiciones). Es así que, el rol que cumplen las membranas biológicas, es más que la simple separación de un compartimento y otro: otorga identidad, determina las capacidades de la célula y, por lo tanto, precisa las condiciones físico-químicas bajo las cuales podrá sobrevivir y reproducirse el organismo.

1.2 Proteínas de Membrana

Como comenzó a esbozarse en la sección anterior, las proteínas presentes en las membranas (PM) cumplen roles fundamentales en la vida de la célula, llevando a cabo múltiples funciones, dentro de las cuales se encuentran el transporte selectivo de compuestos desde y hacia el exterior, la síntesis de ATP, el reconocimiento de moléculas en el exterior, la adhesión y comunicación celular y la de ejecutar diversas reacciones enzimáticas. No obstante la relevancia de la composición lipídica en las propiedades elementales de las membranas, la arquitectura general de la bicapa, es sustancialmente la misma en la mayoría de los organismos (siendo, quizá, las Archaeas quienes se despeguen más significativamente de la norma, al poder presentar monocapas lipídicas y contar con la presencia de distintos tipos de lípidos de los que se encuentran en Bacteria y Eucaria). De forma muy distinta, las posibles combinaciones que pueden hacerse de proteínas (en función del *tipo* de proteína y de *cantidades*), se despliegan casi en un número infinito. Por lo tanto, a este nivel, no solo cada organismo sino cada célula, dentro de cada tejido (en aquellos multicelulares) e incluso cada región subcelular, puede presentar su propio y único batallón de proteínas que, además, puede ser variable en el tiempo y contexto. Es entonces, en general, el conjunto de proteínas asociadas a una membrana quien da la verdadera identidad a la célula (u organelo) y marca cuáles funciones podrán llegar a efectuarse.

Alrededor del 30% de todas las proteínas en la mayoría de los organismos (Archaea, Bacteria y Eucaria), son PM [Walling & Von Heijne, 1998; Yeagle, 2016]. En general, se las categoriza según su posición relativa en la membrana [Yeagle, 2016]: Las proteínas integrales de membrana (PIM - también denominadas transmembrana) son aquellas que atraviesan completamente la bicapa lipídica. Dentro de este grupo, podemos encontrar proteínas que contienen dominios con estructuras en forma de α -hélices u hojas β . A aquellas con dominios α -hélices cuya cadena polipeptídica atraviesa una sola vez la membrana, se les denominan monotópicas, mientras que las que lo hacen varias veces, son politópicas. Dentro de las hojas β , pueden encontrarse dos grandes clasificaciones: las hélices β y los barriles β . Ambos tipos de proteínas se caracterizan por estar compuestas de varias estructuras de hojas β , la diferencia radica en cómo estas están dispuestas en relación a las otras [Kennedy, 1978; Lodish et al., 2016]. Por otro lado, se encuentran las proteínas ancladas a lípidos. En este caso, la proteína se encuentra en la superficie de la membrana, unida de forma covalente a lípidos que forman parte de la bicapa. Por último, tenemos las proteínas periféricas de membrana, que se encuentran unidas de forma indirecta, a través de la interacción con otras proteínas ancladas a lípidos o bien por interacciones débiles con las cabezas hidrofílicas de los fosfo- o esfingolípidos.

Tomando la información anteriormente expuesta, resulta diáfano que las PM presentan alta diversidad y relevancia y, en parte, dependerá de su localización y relación con la bicapa lipídica las posibles funciones que puedan tener asociadas. En virtud de ello, son herramientas elementales para las células, que median el vínculo con el entorno que les rodea, les otorga identidad y las define. De esto se desprende que cada microorganismo o tipo celular debería contar con su propio escuadrón de proteínas de membrana, aceptando los costos que requiere su manutención en nombre de la ventaja evolutiva que le confiera. De estos costos, especialmente en relación a su síntesis, se hablará en el próximo apartado.

1.3 Traducción de Proteínas de Membrana

El proceso aceptado de síntesis proteica, según el famoso dogma central de la biología molecular, implicaría que se parte de la secuencia genómica en el ADN y, por medio de la maquinaria de transcripción, dicha secuencia es transcrita a una molécula de ARN, llamada ARN mensajero (ARNm). Posteriormente, la maquinaria de traducción hace su parte actuando sobre esta molécula, traduciendo la información contenida en ella y formando una cadena polipeptídica. Esta maquinaria de traducción, a saber, ribosomas, ARN de transferencia (ARNt) y otras moléculas que asisten durante el proceso, se encuentran, generalmente, en el citosol. Por tanto, el proceso de síntesis proteica se llevaría a cabo, al menos en las etapas iniciales, en ese compartimento, donde el componente que se encuentra en mayor proporción es el agua. En el caso de procariontes, la ausencia de un núcleo definido por membranas, hace que el cromosoma se encuentre en contacto más directo con los componentes del citoplasma y por lo tanto con los ribosomas y demás factores que participan de la traducción. Es por este motivo, que la transcripción y la traducción suceden, habitualmente, en forma simultánea. En cambio, en eucariotas, el ARNm debe primero ser exportado del núcleo hacia el citosol, para recién allí ser traducido a proteínas. El caso para ambos tipos de células, sean pro- o eucariotas, es que las proteínas comenzarían su síntesis en el ambiente citosólico, con todo lo que esto lleva aparejado. Para proteínas solubles no sería gran inconveniente, ya que su lugar de destino (si no fuera el mismo citosol) contendría propiedades similares a las encontradas en su lugar de síntesis. Por ende, su composición aminoacídica sería tal que las interacciones que formaría con el entorno acuoso serían las “correctas”. Usualmente este tipo de proteínas estarían compuestas, en gran parte, por aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas, al menos en las regiones que estuvieran expuestas al medio. Empero, cuando se trata de la síntesis de PMs la situación ya no es la misma. Como se detalla más arriba, éstas usualmente se encuentran insertas en la bicapa, lo que supone que la cadena polipeptídica debería estar compuesta por aminoácidos cuyas cadenas laterales sean compatibles con el entorno lipídico en el que van a estar interactuando, es decir, deberían tener características hidrofóbicas. Es fácil imaginar el desafío que la traducción de PMs (sobretudo de las PIMs) implicaría para la célula. Si se sintetizaran en el citosol, sin más, a medida que fueran emergiendo del ribosoma, la interacción con componentes del medio acuoso podría llevar a plegados incorrectos, ya que el entorno en el que serían sintetizadas diferiría notoriamente del de su destino. Esto no solo podría ocasionar que la proteína

resultara en una conformación no funcional, sino que además podrían interactuar con otras proteínas de componente hidrofóbico y así formar agregados, que podrían resultar tóxicos para la célula. Dado el alto número relativo de PMs y su relevante rol en la interacción de las células con su ambiente (y por lo tanto, en su viabilidad y adaptabilidad), es importante que éstas regulen de forma meticulosa su síntesis. Existen varias vías por las cuales las células, guían a las PMs hacia las membranas, donde se insertan de forma co- o post- traduccional, procurando un correcto plegado de las proteínas. En este trabajo, nos centraremos particularmente en un mecanismo co-traduccional, que ha mostrado ser universal y el cual se detallará en la siguiente sección.

1.3.1. La Ruta Signal Recognition Particle - Direccionamiento Co-Traduccional

Tal como se mencionaba, las células tienen importantes mecanismos de regulación de la traducción de PMs, que aseguran que su síntesis sea llevada a cabo en el lugar y tiempo que corresponda, evitando la posible agregación citosólica o el plegamiento incorrecto. La ruta SRP (por *Signal Recognition Particle*) depende de que el complejo citosólico ribonucleoproteico SRP y su receptor, SR (SRP Receptor - situado en la membrana del retículo endoplásmico (RE) en eucariotas y en la membrana plasmática en procariotas), acerquen al polipéptido nascente al translocón (Sec61p en eucariotas, YEG en procariotas - también en la membrana), para ser insertado a través de ella (**figura 1**). Esta es una vía muy conservada desde bacterias a animales [Keenan et al., 2001; Egea et al., 2005] y estaría implicada en el reconocimiento y el direccionamiento hacia la membrana del RE (o membrana plasmática en bacterias), del complejo Ribosoma-Cadena Polipeptídica nascente (RCN), para PIMs o de secreción, que son destinadas a terminar su síntesis allí. Esto implica que el mecanismo operaría de forma simultánea mientras el ribosoma está traduciendo el ARNm. Se postula que SRP reconocería una secuencia señal (SS) en el N-terminal del polipéptido nascente, interactuando al unísono con la subunidad mayor del ribosoma [Egea et al., 2005; Keenan et al., 2001; Akopian et al., 2013]. Acerca de la SS, su composición y su rol en la ruta, se hablará en el siguiente apartado.

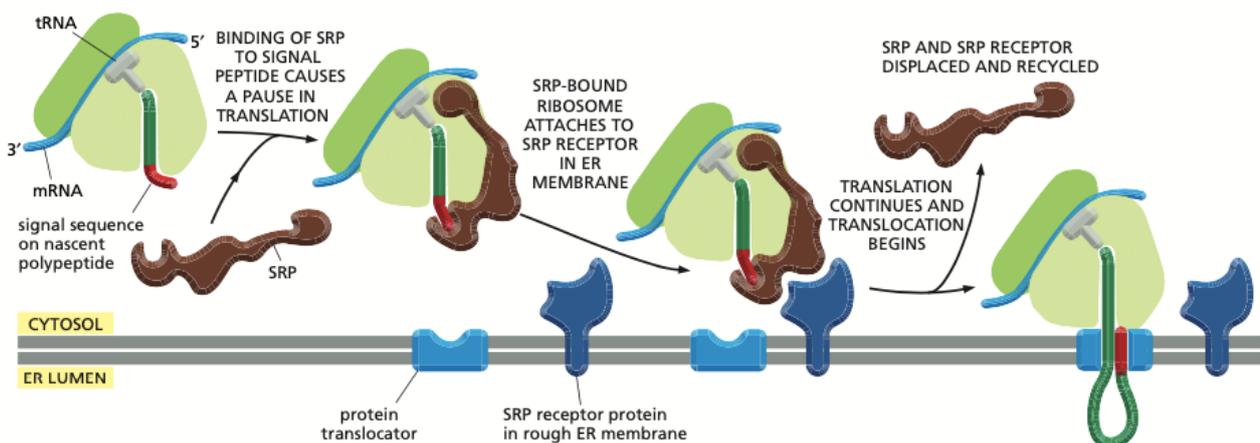


Figura 1. Representación esquemática de la vía de SRP. Tomado de Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 5th ed.

El complejo SRP está compuesto por una molécula de ARN (que varía en tamaño según el organismo) y de una a seis subunidades proteicas (también dependiendo del organismo) (**figura 2**). Si bien la composición de SRP mostraría variaciones según el grupo taxonómico, el centro funcional se mantendría esencialmente igual en todos los organismos. Esto queda explicitado por el hecho de que el complejo bacteriano (que consta de una única subunidad proteica) puede compensar por la pérdida de SRP en células de mamífero (que consta de seis subunidades) y llevar a cabo la función de localización de proteínas hacia el RE [Akopian et al., 2013]. De estas seis subunidades proteicas que pueden encontrarse formando parte del complejo en eucariotas, SRP54 (nombrada así por su peso molecular), es la más conservada del complejo: no solo pueden encontrarse homólogos en casi todos los eucariotas, sino que también su homólogo en bacterias (Ffh) sería la única proteína componente de SRP en dichos organismos [Akopian et al., 2013; Keenan et al., 2001; Stroud & Walter, 1999; Ogg & Walter, 1995]. La misma consta de un sitio de unión al ARN (M-dominio, rico en metionina), un dominio con actividad GTPasa y estaría fuertemente implicada en el reconocimiento de las SS en los polipéptidos nacientes y en su translocación a la membrana del RE [Akopian et al., 2013]. Se postula que allí interactuaría con la SR, que también muestra actividad GTPasa. Ambas pueden interaccionar entre sí en su forma unida a GTP. Al hacerlo, sufren una activación recíproca que lleva a la hidrólisis de las dos moléculas de GTP unidas a ellas y la subsiguiente disociación de SRP y SR, cuando el polipéptido ya se encuentra penetrando la membrana a través del translocón [Nagai, 2003]. A grandes rasgos, SRP eucariota puede ser dividido en 2 dominios: El dominio **S** - del cual forma parte SRP54, junto con otras subunidades proteicas (SRP19 & 68/72 en mamífero) y ciertos dominios internos de la molécula de ARN, y el dominio **Alu** - compuesto por los extremos 5' y 3' del ARN, en conjunto con las restantes subunidades proteicas (SRP9/14 en mamífero). Se postula que el dominio S, estaría implicado en el reconocimiento y translocación del péptido naciente a través de la membrana y el Alu en generar una pausa traduccional, la cual se discutirá más adelante [Akopian et al., 2013]. Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual SRP reconoce al RCN correcto y lo guía hacia la membrana del RE, aún no ha sido completamente descrito. Si sucede por reconocimiento en cambios conformacionales en el ribosoma o en elementos específicos que compongan el N-terminal del polipéptido naciente, permanece aún como una interrogante. Quizás al final del siguiente apartado, cuando se hable de la secuencia señal, el motivo quede un poco más explicitado.

1.3.2 La Secuencia Señal

Muchas de las proteínas que contienen una SS son proteínas transmembrana que, como se hacía alusión más arriba, por su carácter hidrofóbico son incapaces de plegarse correctamente en el citosol, donde potencialmente formarían agregados tóxicos. Su síntesis, entonces, tiene lugar a la vez que son insertadas de manera co-traduccional en la membrana del RE en eucariotas o membrana plasmática en bacterias, a través de la ruta SRP. Al contrario de lo que podría esperarse, dado el carácter conservado del mecanismo general mediado por SRP que se ha señalado, la SS presenta muy poca conservación a nivel de secuencia, mostrando grandes variaciones en composición aminoacídica, incluso para distintas proteínas dentro de un mismo organismo [Zhao et al., 2021]. Sin embargo, varios estudios han podido determinar que existirían ciertas características generales de este tipo de secuencia: se las encuentra en el extremo N-terminal de las proteínas (muchas veces es incluso escindida posteriormente, por lo que no se la encuentra en la proteína madura) y consta de un largo de entre 20 a 30 residuos, dentro de los cuales se encuentra un “core” hidrofóbico no menor a 6 aminoácidos (usualmente entre 6-12), flanqueado hacia el N-terminal por uno o más aminoácidos polares positivos y hacia el C-terminal por una región polar, en la que puede encontrarse el sitio de clivado para una proteasa. Muchas veces, para proteínas politópicas, el mismo primer segmento transmembrana puede officiar de SS [Keenan et al., 2001; Stroud & Walter, 1999, Hedge & Bernstein, 2006]. Por lo tanto, más allá de estas propiedades estructurales físico-químicas, existen pocas restricciones respecto a la naturaleza que debe presentar una secuencia dada para ser una SS, lo que implica que SRP sería capaz de reconocer una amplísima cantidad de secuencias en los polipéptidos nacientes. Así pues, la promiscuidad en el reconocimiento de secuencias que exhibe SRP, genera cierta dificultad a la hora de predecir si una proteína contiene una SS y, sobretodo, a la hora de describir a detalle los mecanismos que están detrás de la gran

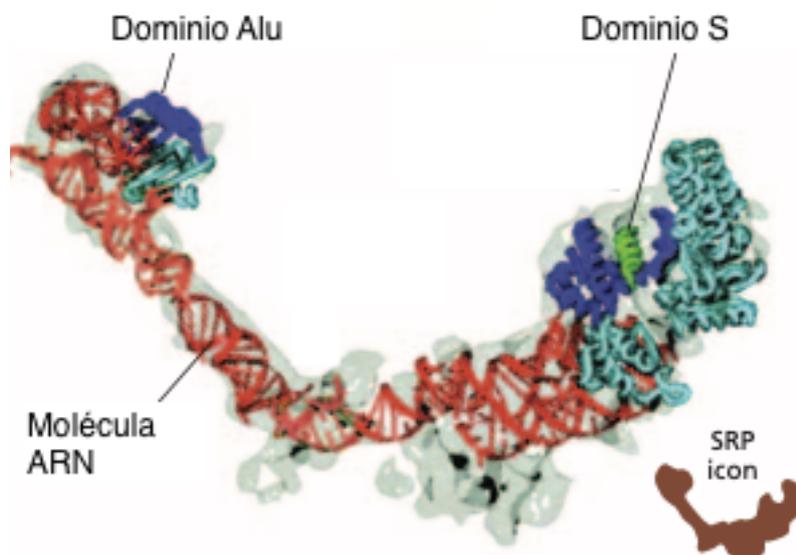


Figura 2. Modelado esquemático de SRP de Mamífero. Modificado de Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 5th ed.

eficiencia que muestra el complejo, en la selección y localización de los RCNs correctos, hacia la membrana correcta.

Algunas evidencias apuntan a que el reconocimiento de la SS por parte de SRP se da por una interacción directa con el M-dominio de la subunidad Srp54, una vez que la secuencia emerge del ribosoma [Keenan et al., 2001; Ogg & Walter, 1995; Pechmann et al., 2014; Hedge & Bernstein, 2006]. No obstante, también se ha visto que el ribosoma mismo podría jugar un rol preponderante en el reclutamiento de SRP [Akopian et al., 2013]. Este es un detalle importante, que se retomará más adelante en este trabajo.

1.4. Control Cinético de la Traducción en la Ruta SRP

Varios autores han sugerido que sería necesaria una pausa en la elongación en los inicios de la traducción de PMs, para su adecuada localización hacia la membrana del RE o membrana plasmática, por parte de SRP [Akopian et al., 2013; Chartron et al., 2016; Collart & Weiss, 2019; Keenan et al., 2001; Kèpés, 1996; Lakkaraju et al., 2008; Pechmann et al., 2014; Samatova et al., 2021; Zhao et al., 2021]. Empero, la causa y función de dicha pausa, es aún un motivo de debate. Algunos postulan que es SRP quien genera la pausa, a través de la interacción de su ARN en el dominio Alu, con el sitio de unión para factores de elongación en el ribosoma, deteniendo de esta forma la elongación de la cadena polipeptídica [Akopian et al., 2013 ; Keenan et al., 2001; Lakkaraju et al. 2008]. Esta última es una proposición en controversia, debido a que el mecanismo descrito podría únicamente ser algo exclusivo de eucariotas, ya que en la mayoría de los procariontes, SRP suele carecer de dicho dominio y sin embargo, la ruta SRP mantiene su eficacia en todos los órdenes de la vida. Además, existen algunas evidencias de que el dominio Alu en SRP de humanos, tendría poca participación en la unión de SRP con el ribosoma [Wild et al., 2019]. Una explicación más general de la posible pausa traduccional, sería la presencia de elementos intrínsecos en el extremo 5' de los ARNm que pudieran estar operando a modo de enlentecer la elongación. Como uno de estos posibles elementos, la presencia de codones raros en sitios clave del transcrito podría ser un candidato fuerte [Chartron et al., 2016; Kèpés, 1996; Pechmann et al., 2014].

1.5 Uso de Codones

Una de las premisas principales acerca del código genético, es que es degenerado. Habiendo más posibles combinaciones de nucleótidos en tripletes que aminoácidos existentes, un mismo aminoácido puede ser codificado por más de un codón; es decir, existen codones que serían sinónimos. En varios casos, puede ser el mismo ARNt el que lea los codones sinónimos, pero es usual que sean distintos ARNts. A aquellos que llevan el mismo aminoácido, pero tienen distinta secuencia en el anti-codón, se los denomina ARNt isoaceptores [Samatova et al., 2021]. Se ha visto que los organismos no usan los codones sinónimos de forma aleatoria, sino que existe una preferencia hacia la presencia de un *set* específico de codones, sobre otros, lo que se denomina sesgo en el uso de codones [Sharp & Matassi, 1994]. Este sesgo no solo se observa entre organismos de distintos grupos taxonómicos, sino entre genes dentro de un mismo organismo. En

principio, la presencia de un codón sinónimo u otro en el ARNm, no significaría una alteración de la proteína propiamente dicha, ya que no se estaría modificando la secuencia aminoacídica en la cadena polipeptídica. Empero, el hecho de que la selección opere a favor del mantenimiento de este sesgo, daría indicios de que, a algún nivel, conferiría cierta ventaja. De las primeras hipótesis que surge plantearse frente a estas evidencias, es que el uso diferencial de codones podría significar algún cambio a nivel de la expresión de las proteínas. La existencia de este sesgo, tiene como efecto, que hayan codones frecuentes, que se encuentran en mayor proporción relativa dentro del genoma de un organismo y codones raros, con menor frecuencia de aparición. También implica la presencia de codones óptimos y no-óptimos; que un codón sea óptimo para un organismo, implica que el ARNt que lo lee, sea abundante en la célula. Y como codón sinónimo no-óptimo, se entiende aquel cuyo ARNt se encuentra en escasez, en relación a los otros que codifican para el mismo aminoácido. En general, los codones frecuentes suelen ser óptimos y los raros, no-óptimos. Resulta intuitivo imaginarse que si la concentración relativa de un ARNt determinado es alta, el codón correspondiente será reconocido rápidamente y por lo tanto el ritmo de síntesis proteica será mayor. En cambio, un codón no-óptimo, cuando presente, significaría una disminución en la velocidad de la traducción en dicho sitio, debido a que se requerirá un mayor tiempo en “encontrar” el ARNt que lo lea. El posible retardo en la síntesis proteica que generaría la presencia de codones no-óptimos, podría tener consecuencias en varias esferas, como ser en la tasa de expresión o en el plegamiento de las proteínas.

1.6 *Aspergillus nidulans* – Organismo Modelo

Este trabajo, como se viene sugiriendo, se contextualiza en el estudio del rol de SRP en la regulación de la traducción de PMs. Para ello, es importante contar con un modelo que sea de fácil manipulación, tanto genética como práctica. Además, no menor, es que el organismo utilizado permita realizar extrapolaciones a otros organismos, que puedan tener implicancias en otras áreas que sean de relevancia para la sociedad.

En el presente caso, se trabajó con el hongo ascomiceto filamentoso *Aspergillus nidulans*, cuyas características lo hacen un excelente organismo modelo. El mismo ha sido usado desde la década de los 50 para estudios genéticos y moleculares [Etxebeste & Espeso, 2019], volviéndolo un organismo muy bien caracterizado en términos genómicos, de crecimiento y reproducción. Siendo así, se han desarrollado y puesto a punto, muchas técnicas moleculares para *A. nidulans*. Esto, sumado a la existencia de bases de datos que recopilan toda la información genética y molecular conocida del hongo hasta la fecha [<http://www.aspergillusgenome.org>], facilita enormemente el trabajo con él. Varias investigaciones que han utilizado *A. nidulans* a lo largo de las décadas, han aportado a la comprensión de muchísimos mecanismos celulares, como ser la reparación del ADN y el ciclo celular [Todd et al., 2007], lo que destaca la versatilidad y enorme utilidad que ha demostrado este hongo como organismo modelo, para el estudio de numerosas interrogantes.

Es importante destacar que el género *Aspergillus* comprende una cantidad de especies, de las cuales muchas son utilizadas en la producción de alimentos y, otras tantas, son patógenas para

animales y plantas, lo que las vuelve de relevante interés para la salud y la industria de la alimentación [Todd et al., 2007; Etxebeste & Espeso, 2019]. Muchas de estas especies no son de tan simple manipulación, ni están tan extensamente caracterizadas, por lo que estudios en *A. nidulans*, podrían ser utilizados como representativos de estos organismos filogenéticamente tan cercanos (y, quizás, de otros hongos filamentosos, no tan emparentados) y aportar al tratamiento de enfermedades o al mejoramiento de producción alimenticia. Por otro lado, la importancia de este género, ha derivado en que exista a disposición amplia información respecto a varias de las especies que lo componen, en relación a su genoma, al uso de codones y a características metabólicas y de ciclo de vida. Esto proporciona la fantástica oportunidad de hacer análisis comparativos, que facilitan y enriquecen los estudios en *A. nidulans* y, además, permiten la elaboración de un marco evolutivo para los resultados obtenidos.

En cuanto a las facilidades técnicas que presenta este organismo, cabe destacar su rápido crecimiento el cual permite, por un lado, contar con grandes cantidades de biomasa para realizar extracciones proteicas o de ácidos nucleicos y por otro, estudiar su crecimiento a distintas condiciones; todo esto, en un período de tiempo relativamente acotado (en cuestión de unos pocos días). Adicionalmente, los patrones de crecimiento que muestran las colonias de *A. nidulans*, permiten mantener en una misma placa de Petri, una variedad de cepas diferentes coexistiendo, pero manteniéndose aisladas entre sí. En consecuencia, es posible analizar los tipos de crecimiento que demostrarían distintas cepas a una misma condición, en un solo paso. Esto permite más seguridad a la hora de analizar los resultados, de que las diferencias encontradas, efectivamente tengan base en la genética del organismo y no que se deban a posibles diferencias en la manipulación o en la elaboración de los medios y distintas condiciones. Esencialmente, las formas de medir este crecimiento, se basan en la observación de la extensión y densidad del crecimiento de las hifas (diámetro y espesor del micelio de la colonia) y el nivel de esporulación asexual alcanzado (intensidad de color de los conidios, verde o amarillo, dependiendo de la cepa). Esto implica que los distintos comportamientos de crecimiento, pueden ser visualizados a ojo desnudo y en el correr de unos pocos días.

La facilidad en la manipulación genética que demuestra este organismo, permite obtener cepas con auxotrofías (siendo incapaces de sintetizar algún elemento esencial para su crecimiento por ellas mismas) de forma sencilla. Esto resulta por demás útil a la hora de realizar selecciones para análisis genéticos, haciendo crecer a las cepas en presencia o ausencia del compuesto en cuestión.

Una de las dificultades que se pueden encontrar a la hora de realizar ensayos genéticos en este organismo, es que, debido a las características en el ciclo de vida, las hifas pueden fusionarse y por lo tanto permanecer en forma de heterocarionte por un período de tiempo (**figura 3** – panel del

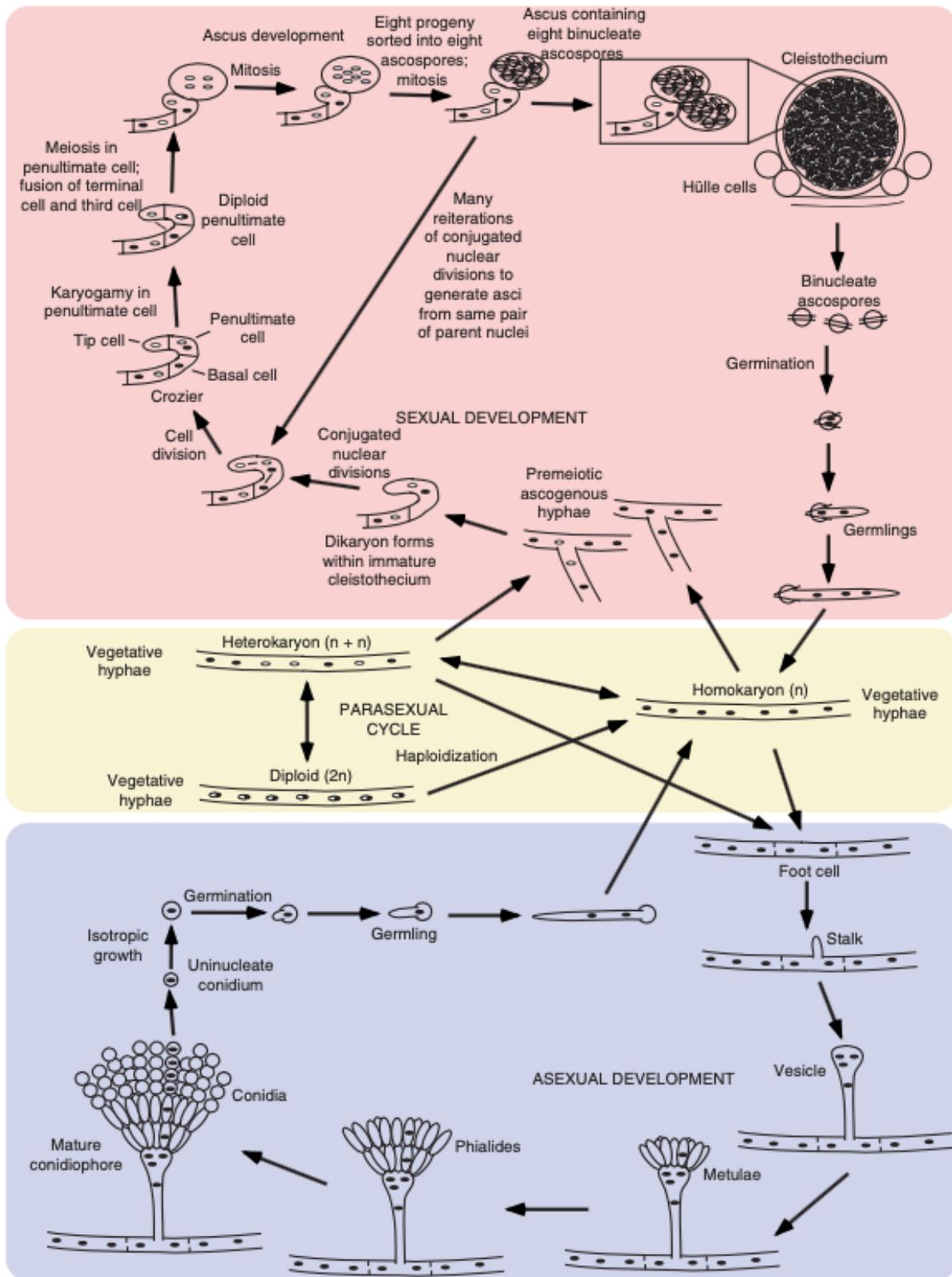


Figura 3. Ciclo de Vida del hongo *Aspergillus nidulans*. Tomado de Todd, Davis & Hynes, *Nature Protocols*, 2007.

medio). Para algunos ensayos en los que se busque la incorporación en el genoma de un fragmento de ADN conteniendo una mutación dada y un marcador de selección (como es el caso de la transformación, que se utilizó en este trabajo), esto puede implicar un pequeño desafío. Ya que, es posible que, en un mismo micelio, coexistan núcleos que hayan incorporado el fragmento y otros que

no, incluso bajo las condiciones pertinentes para el marcador de selección utilizado. No obstante, este obstáculo es fácilmente superado, gracias a otra característica en el ciclo de vida de *A. nidulans*, que es que los conidios (esporas asexuales – **Figura 3**. Panel inferior), sí son uninucleados. Por lo tanto, para obtener colonias que sólo tengan en su genoma el fragmento de ADN deseado, es necesario un paso extra de purificación, en el cual se toman esporas uninucleadas y se inoculan nuevamente, en las condiciones pertinentes de acuerdo al marcador de selección en particular.

Las proteínas de membrana presentan dificultades para su estudio y manipulación, dada la alta hidrofobicidad que las caracteriza y la consecuente baja estabilidad en solución acuosa. Es en este sentido que, su estudio *in vivo* se torna una enorme ventaja y para ello los organismos unicelulares suelen presentar mayores facilidades que los eucariotas superiores. Los hongos (fundamentalmente *A. nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae*) han servido de excelente modelo eucariota, para numerosos estudios de transportadores de membrana [ej.: Abreu et al., 2010; André, 1995; Darlington & Scazzocchio, 1967; Diallinas & Martzoucou, 2019; Gournas et al., 2015; Pateman et al., 1982; Sanguinetti et al., 2014 & 2019; Tavoularis et al., 2003]. Estos han permitido realizar caracterizaciones a nivel de secuencia, de estructura, de regulación de la transcripción y de la traducción, del transporte interno celular, de la cinética y especificidad del transporte de compuestos y de la relación entre estructura-función, de proteínas transportadoras de membrana. Si bien *A. nidulans* es un organismo multicelular, posee ciertas propiedades que facilitan el estudio de este tipo de proteínas. En primer lugar, la facilidad ya mencionada en la manipulación genética, permite obtener diversos tipos de mutantes para estas proteínas, que posibilitan su análisis a distintos niveles (función, localización celular, transporte, etc). A su vez, se ha identificado una etapa morfológica de crecimiento isotrópico en el desarrollo, posterior al comienzo de la germinación y anterior a la emergencia del tubo germinal, en la cual las conidiosporas aún mantendrían su unicelularidad, pero comenzarían a expresar genes característicos del hongo maduro [Kryptou & Diallinas, 2014]. En esta etapa se ha observado que la expresión de muchos transportadores de membrana (como ser, la de todos los genes que codifican para transportadores de compuestos nitrogenados), sería máxima e independiente de la composición del medio [Abreu et al., 2010; Kryptou et al., 2014]. Esto implica que, durante el crecimiento isotrópico de *A. nidulans*, existiría una expresión y distribución homogénea de los transportadores de nutrientes de membrana, que se mantendría a cualquier composición del medio y condición en la que se creciera al hongo, lo cual facilita enormemente su estudio y permite obtener una resolución a nivel de célula individual. Adicionalmente, la característica incolora de las hifas, permite realizar de forma sencilla análisis de localización celular de proteínas de membrana conjugadas a proteínas fluorescentes (como ser GFP), por medio de la observación a microscopio de epifluorescencia o confocal. Otra ventaja técnica, es la de poder acceder a una gran cantidad de proteína, de forma relativamente rápida y asequible. Ya que, la inoculación de una sola placa de Petri, incubándola durante 24-48hrs, brinda material suficiente para unos cuantos ensayos, incluso por triplicado, siendo el proceso de extracción proteica sumamente sencillo.

Por último, es relevante destacar que el laboratorio en donde fue llevada a cabo la pasantía, cuenta con vasta experiencia en la manipulación y el trabajo con *A. nidulans*, habiendo perfeccionado sus propios protocolos y generado las cepas pertinentes que se utilizaron como puntapié en esta oportunidad.

1.7 UreA - Transportador de urea en *A. nidulans*

A. nidulans, como muchos microorganismos, es capaz de utilizar el compuesto urea como fuente de nitrógeno, por lo que su transporte desde el ambiente hacia el interior de la célula, es un elemento clave para su crecimiento en un medio donde dicho compuesto se encuentre presente. Para ello, este hongo, además de demostrar cierto nivel de transporte pasivo a través de la membrana (sobre todo a concentraciones altas de urea en el medio), también cuenta con una proteína (**UreA**) que lo transporta de forma activa y específica. UreA es parte de la familia Solute:Sodium Symporter (SSS), de la cual forman parte transportadores de urea de organismos como la levadura *S. cerevisiae* y la planta *A. thaliana* [Abreu et al., 2010]. Es una proteína integral politépica, que atraviesa numerosas veces la membrana plasmática del hongo (cuenta con 15 segmentos transmembrana), es el único

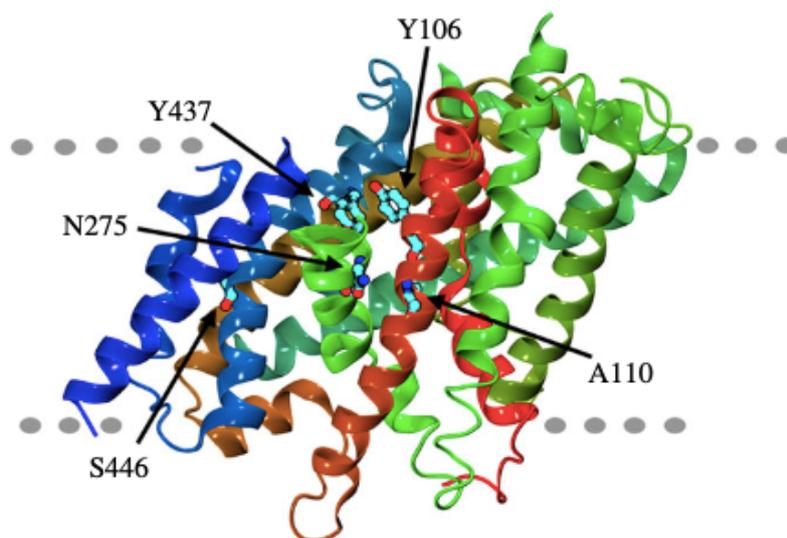


Figura 4. Modelado parcial de la proteína transportadora de urea en el hongo *A. nidulans* (UreA). Los puntos grises representan la bicapa lipídica, encontrándose la cara citosólica hacia abajo y el exterior celular hacia arriba. Tomado de Sanguinetti et al., *Open Biol.*, 2014.

transportador activo de urea que presenta el organismo y actúa como un *symporter* de H^+ , siendo su actividad dependiente del pH extracelular [Abreu et al., 2010] (**Figura 4**). En el mismo trabajo citado, los autores demostraron que la expresión a nivel transcripcional de *ureA*, no sería dependiente de la presencia de urea, pero sí estaría sujeta a la disponibilidad de amonio en el medio (represión catabólica por nitrógeno). Además, el acceso a este compuesto, desencadenaría un mecanismo post-traduccional que provocaría la endocitosis de la proteína UreA que se encuentre en la membrana. Es destacable mencionar que, estos mismos autores, identificaron ortólogos de UreA en todas las especies *Aspergillus* con genoma conocido, lo que habla de un importante nivel de conservación de la proteína.

Resulta de especial interés mencionar que, previamente en el laboratorio donde fue llevado a cabo el presente trabajo, se identificó en el ARNm que codifica para esta proteína, un par de codones consecutivos no-óptimos ubicados en las posiciones 24 y 25, cercanos al comienzo del primer segmento transmembrana. Estos, curiosamente, se encuentran altamente conservados en varias especies *Aspergillus*, para las cuales el uso de codones está bien determinado y también resultan ser no-óptimos [Iriarte et al., 2012; Sanguinetti et al., 2019]. Los datos expuestos podrían estar indicando que habría una presión selectiva que estaría manteniendo a dichos codones. Por lo que su presencia, lejos de ser de carácter aleatorio, podrían estar cumpliendo alguna función relevante.

1.8 Posible Rol de SRP en la Traducción de UreA

Con el propósito de estudiar la posible función que podrían estar cumpliendo estos codones no-óptimos en las posiciones 24 y 25, en el mensajero para UreA, previamente en el laboratorio se generaron cepas mutantes para éstos. En ellas se realizó una sustitución por los sinónimos óptimos (*ureA24,25*), con el fin de observar cuáles podrían ser las consecuencias del cambio. Lo que se observó es que las cepas muestran deficiencias en el transporte a 37°C de urea y de su análogo tóxico 2-tiourea (2-TU). Esta deficiencia queda evidenciada por la dificultad que muestra *ureA24,25* para crecer en urea como única fuente de nitrógeno y por la resistencia parcial a la 2-TU, a la misma temperatura. La insuficiencia queda restaurada, al menos parcialmente, cuando la misma cepa crece a 25°C [Sanguinetti et al., 2019]. En adición a esto, al realizar comparaciones de cantidad de ARNm para UreA en cepas salvajes y *ureA24,25* creciendo a 37°C, no se observan niveles significativamente dispares entre ambas. Sin embargo, en cepas generadas en el laboratorio, que expresan la proteína UreA unida a GFP (UreA::GFP), análisis de Western Blot contra la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) sobre extractos crecidos a 37°C, demuestran una gran reducción en los niveles de proteína en los mutantes, con relación a los salvajes. En concordancia con los fenotipos de crecimiento descritos, los niveles de proteína se restauran parcialmente cuando la cepa *ureA24,25* es crecida a 25°C. Asimismo, la observación a microscopio de epifluorescencia de las mismas cepas expresando UreA::GFP crecidas a 37°C revela que, para *ureA24,25* casi no se detecta señal de GFP, mientras que esta proteína sí sería detectable para la cepa salvaje, observándose una clara señal a nivel de la membrana. Sin embargo, en cepas que crecieron a 25°C, vuelve a observarse señal en la membrana de *ureA₂₄₂₅*, a niveles que pueden ser comparables con lo observados para la cepa *wt*. Es importante destacar que a 37°C, se observa además muy poca acumulación de GFP libre en el lumen de vacuolas en mutantes *ureA24,25*. La acumulación de GFP en vacuolas es producto del “turnover” natural de UreA::GFP, siendo la GFP refractaria a la degradación. En contraste, la señal en las vacuolas es claramente detectable en la cepa salvaje y en *ureA24,25* creciendo a 25°C (aunque en menor medida) [Sanguinetti et al., 2019]. Tomando todos estos resultados en conjunto, parece razonable proponer que el defecto en el transporte descrito anteriormente y en los niveles de UreA en el mutante, se deba a defectos a nivel de la síntesis proteica y no a niveles alterados en la transcripción, ni a un aumento de la degradación de la proteína.

En secciones anteriores, se mencionó que la presencia de los codones no-óptimos en los extremos 5' de los ARNm que codifican para PMs, podría suponer una pausa en la elongación, que podría resultar fundamental para el reconocimiento de la SS por parte de SRP, antes de que los RCNs sean guiados hacia la membrana del RE. Los codones no-óptimos en las posiciones 24 y 25 del ARNm para UreA, podrían estar cumpliendo esta función y, por lo tanto, podrían tener un rol preponderante en la interacción de SRP con el RCN. Esta pausa sería eliminada en mutantes que contengan la sustitución de los codones 24 y 25 por sus sinónimos óptimos, limitando el tiempo para el reconocimiento por parte de SRP u otras chaperonas necesarias para la correcta biosíntesis de UreA. Con este supuesto en mente, la deficiencia en el transporte de urea y análogos en dichos mutantes, podría estarse debiendo a la falta de biosíntesis de la proteína UreA, por una alteración de las etapas iniciales de la traducción [Sanguinetti et al., 2019], lo cual podría estar dando indicios de que la cinética cumple algún rol en la traducción del transportador UreA.

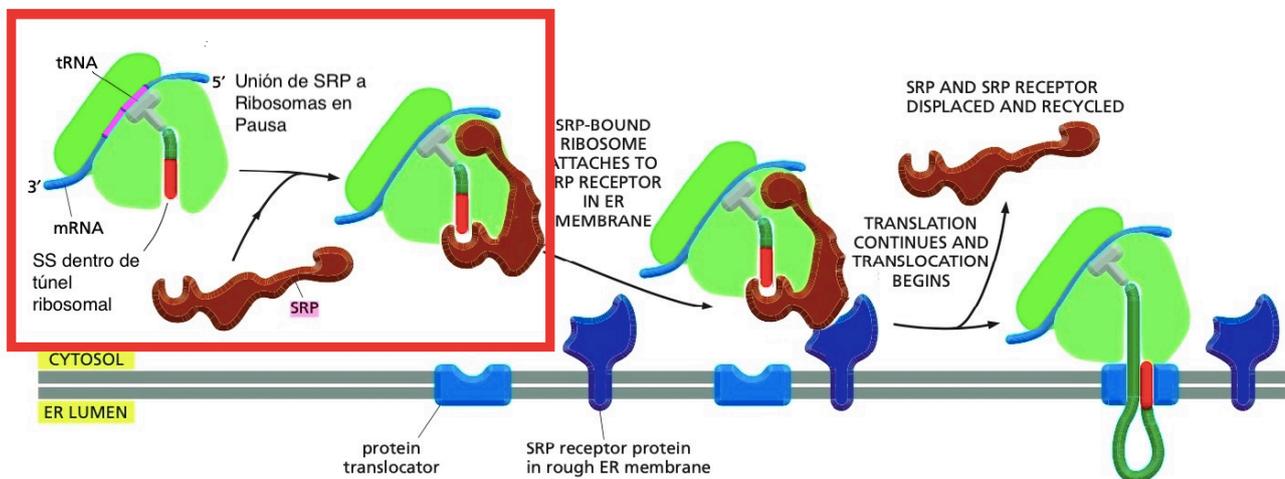


Figura 5. Representación esquemática del modelo propuesto para la vía de la SRP, en la traducción de la proteína UreA en el hongo *A. nidulans*. El recuadro rojo, muestra la diferencia principal con el modelo general aceptado (ver figura 1) en los pasos iniciales del reconocimiento de ribosomas traduciendo, por parte de SRP. En violeta, se marcan los codones no óptimos, en las posiciones 24 y 25 del ARN mensajero (mRNA en la imagen). Modificado de Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 5th ed.

Si la función que estuvieran cumpliendo dichos codones fuera la de hacer las veces de elemento intrínseco que participe en la regulación de su propia traducción, posiblemente generando un retardo en la misma, resultaría llamativo que la pausa se diera a esa altura en la elongación, ya que en dicha etapa el polipéptido naciente aún no habría emergido del túnel ribosomal (que alberga cerca de 30 aminoácidos). Esto podría suponer que SRP reconocería la señal que indica su destino en la membrana cuando aún el polipéptido no ha emergido del ribosoma. Este tipo de mecanismo, en el cual secuencias dentro del túnel ribosomal tienen influencia en la interacción de los RCNs con SRP, ha sido descrito para levaduras [Berndt et al., 2009]. Y en la bacteria gram (-) *E. coli* (cuyo SRP carece de dominio Alu), se ha identificado un proceso en el reconocimiento por parte de SRP, que consta de una unión inicial con baja afinidad a ribosomas traduciendo, aún cuando la cadena polipeptídica no se halle expuesta [Mercier et al., 2017]. Siendo así, si bien la interacción de SRP con ribosomas en etapas muy iniciales de la traducción de proteínas transmembrana ha sido

documentada, el rol anteriormente propuesto para los codones no-óptimos en las posiciones 24 y 25 del mensajero para UreA, implicaría una novedad en términos de mecanismo de acción para el modelo *A. nidulans* (**figura 5**).

1.9 Tag HA

Para muchos ensayos donde se busca estudiar proteínas específicas por medio de inmunodetección, una estrategia útil y práctica frecuentemente usada, es la de conjugar la proteína problema, a un pequeño péptido de secuencia conocida, que funcione para marcarla, es decir introducirle un *tag*. Esto evita tener que generar anticuerpos específicos contra la proteína en cuestión (el cual puede ser un procedimiento engorroso y que puede llevar mucho tiempo) y poder utilizar un anticuerpo comercial contra el tag específico. Existen varios *tags* de uso habitual que han sido probados en diversos sistemas y que, al ser de un tamaño tan pequeño, no afectarían la función ni la estructura general de la proteína a la que están conjugados.

El tag HA es uno ampliamente utilizado, para el cual existen varias alternativas de anticuerpos comerciales. Este consta de 9 aminoácidos, que son parte de la glicoproteína hemaglutinina del virus influenza humana. Al ser tan pequeño, muchas veces este queda “enterrado” dentro de la proteína problema, dejándolo inaccesible para el reconocimiento por parte de los anticuerpos; es por esto que en muchos casos (como lo es en el presente trabajo), se introducen tres repetidos del tag, a modo de hacer más eficiente la inmunodetección.

2. Hipótesis

La presencia de codones de uso poco frecuente en las posiciones 24 y 25 del ARNm para UreA, podrían estar operando como elemento intrínseco del mensajero, que funcione a modo de instaurar una pausa en la traducción. La cual sería necesaria para el reconocimiento de la SS por parte de SRP.

3. Objetivo general

Con el fin de poner a prueba la hipótesis planteada, en este trabajo se comenzará el estudio de la interacción entre SRP y RCN, para el mutante *ureA*_{24,25} en comparación con una cepa salvaje.

Para esto, se propone llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de SRP y cuantificación del ARNm de *ureA* unido a ésta en cepas salvajes y mutantes, para lo que se requiere introducir una marca triple-HA en la subunidad SrpA (ortólogo de Srp54) de la SRP, en el hongo *Aspergillus nidulans*.

3.1 Objetivos específicos:

- 1) Generación de la construcción *3HA-srpA*.
- 2) Transformación de cepas *wild type* y *ureA*_{24,25} con la construcción.
- 3) Análisis de las cepas transformadas.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cepas utilizadas

Para la generación de la construcción génica por Fusion-PCR (ver **sección 4.4**) y el ensayo de western blot (ver **sección 4.3**) se utilizó la cepa MVD 425. Para las transformaciones (ver **sección 4.10**) se trabajó con las cepas MVD 2425B (mutante de sustitución sinónima en los codones 24 y 25 en el gen para UreA) y la MVD 10A como salvaje para UreA (*wt*). Para los análisis de fenotipo de los transformantes (ver **sección 4.10.2**), se utilizó además la cepa MVD 001, como cepa control. Todas las cepas utilizadas fueron generadas en el laboratorio previamente y los genotipos de las mismas figuran en el anexo (ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**).

4.2 Medios de Cultivo

Medio completo (MC):

20 mL solución de sales
10 mL solución vitaminas
10 mL solución casaminoácidos
10 gr glucosa (dextrosa)
2 gr peptona
1 gr extracto de levadura

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo (autoclave a 121°C) por 15-20 minutos.

Medio Mínimo (MM):

20 mL solución de sales
10 g de glucosa (dextrosa)

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza mediante calor húmedo (autoclave a 121°C) por 15-20 minutos.

Este medio debe completarse con una fuente de nitrógeno y los suplementos nutricionales correspondientes, según las autotrofías de las cepas utilizadas.

Solución de Sales :

26 g cloruro de potasio
26 g sulfato de magnesio
76 g fosfato de potasio
50 mL elementos traza

Se lleva a un litro con agua destilada y se esteriliza mediante calor húmedo (autoclave a 121°C) por 15-20 minutos. Se guarda 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-aminobenzoico

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
40 mg sulfato de cobre pentahidratado
800 mg sulfato de manganeso dihidratado
800 mg molibdato de sodio dihidratado
8 g sulfato de zinc heptahidratado

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (autoclave a 121°C) por 20 minutos y se conserva a 4 °C.

Suplementos nutricionales:

Las cepas utilizadas contienen auxotrofías, lo cual permite su selección al crecerlas con o sin los compuestos que son incapaces de sintetizar. Los suplementos utilizados para este fin durante el trabajo, fueron riboflavina (ribo), piridoxina (pyro), ácido *p*-aminobenzoico (paba) y tartrato de amonio. El primero es una vitamina (B₂) requerida para la respiración celular, el segundo también es una vitamina (B₆) requerida para la síntesis de aminoácidos y lípidos. Paba es un intermediario en la síntesis de folato, compuesto necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y el amonio puede ser utilizado por el hongo como fuente de nitrógeno.

Para todo los suplementos se preparan soluciones 100 veces concentradas respecto a la final (100 X); Éstas son esterilizadas por calor húmedo y se conservan a 4°C.

En las placas de Petri la concentración final, será de 1 X.

En la explicación de cada ensayo, se especificará el medio utilizado y los suplementos nutricionales pertinentes.

4.3 Western Blot

Previamente, en el laboratorio se generó una cepa HA::SrpA, es decir, conteniendo un solo tag HA (MVD 425 – ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**), la cual se planeaba utilizar en ensayos de inmuprecipitación. Debido a dificultades que se han visto en la efectividad en estos ensayos con anticuerpos anti-HA (α -HA), en muestras conteniendo la proteína problema conjugada a un solo tag de este tipo, en el laboratorio se planteó generar una nueva cepa conteniendo 3 repetidos del tag. Esto es a modo de mejorar la eficiencia en los futuros ensayos de inmuprecipitación. Si bien en un ensayo de western blot, es posible que los anticuerpos puedan reconocer un solo HA, las diferencias en las condiciones que primarían en una inmuprecipitación, podrían hacer que uno solo no fuera suficiente. En el primer ensayo, en condiciones desnaturalizantes, la proteína no se encontraría en su conformación nativa. En cambio, en una inmuprecipitación sí y, muchas veces, el tag podría quedar “enterrado” dentro de ella, dejándolo inaccesible para el reconocimiento por parte de los anticuerpos. Es por esto que muchos investigadores, con experiencia en este tipo de ensayos, han visto que es necesaria la incorporación de 3 tag, para que resulte más eficiente.

Siendo así, la cepa MVD 425 fue utilizada como fuente de partida para el presente trabajo. A modo de corroborar que ésta contuviera el tag y también para poner a prueba la eficiencia de los anticuerpos α -HA, se realizó un ensayo preliminar de western blot.

4.3.1 Extracción Proteica

El primer paso consistió en realizar un extracto proteico. Para ello se hizo crecer la cepa en MC con 3% agar (para simplificar la colección de esporas y que en el proceso no se raspe agar). Las esporas colectadas fueron suspendidas en 7,5 mL de 0,01% Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich) (la suspensión en detergente mejora la suspensión de las esporas, que son altamente hidrofóbicas y, por lo tanto, insolubles en agua) e inoculadas en 200 mL de MM líquido con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno y los suplementos correspondientes (*pyro* y *paba* – Ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**). Se incubaron “*overnight*” a 37°C y con agitación a 140 r.p.m. Se filtró el micelio crecido por medio de filtros blutex y se lavo con agua estéril. Luego de secar el micelio entre hojas de papel, se procedió con el lisado celular, utilizando nitrógeno líquido y un mortero hasta obtener un polvo blanco. Se tomaron ~200 – 300 µg de micelio molido en un Eppendorf de 2 mL, se resuspendió en 1 mL **Buffer de Precipitación***¹ y se vortexeó por 10-20 segundos. Para ayudar con la resuspensión se pipeteó unas cuantas veces (más de 10) con una pipeta automática p100. Posteriormente, se incubó 10 minutos en hielo y se centrifugó otros 10 minutos a 4 °C a 13000 rpm. Luego se removió el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de EtOH 100% helado, manteniendo especial atención en la resuspensión: usando una pipeta p100, primero se rompen los agregados de micelio con la punta del tip sellada y engrosada por quemado y posteriormente con un tip sano. Luego, se pipeta arriba y abajo varias veces con una pipeta p200, hasta que no se observen más agregados de micelio. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 4 °C a 13000 rpm. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con 1 mL de acetona helada, nuevamente, buscando resuspender bien y repitiendo el procedimiento utilizado en el lavado con EtOH 100% (estos pasos de resuspensión son fundamentales para recuperar la mayor cantidad de proteína posible). Se removió el sobrenadante y se secó el pellet al aire a 60°C unos 30-40 minutos o hasta que este se tornara de un color blancuzco y se comenzaran a formar grietas. Luego, se disolvió el pellet en 400-500 µL de **Buffer de Extracción***¹. Nuevamente en este paso se prestó especial atención en obtener una resuspensión homogénea y se procedió resuspendiendo unas cuantas veces con una pipeta automática p100 al inicio y luego otras tantas con una p200. ésta se incubó 15 minutos en hielo y se centrifugó otros 15 minutos a 4 °C a 13000 rpm. Por último, se tomó el sobrenadante y se traspasó a un tubo Eppendorf nuevo.

***1 Composición Buffers:**

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 dilución 1:500 (se agrega inmediatamente antes de usar).

4.3.2 Cuantificación de Proteínas - BCA

Posteriormente, a modo de evaluar la eficiencia de la extracción de proteínas del paso anterior, se procedió a realizar una cuantificación utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Este se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} en presencia de polipéptidos conteniendo 2 o más enlaces peptídicos. El compuesto BCA al reaccionar con el Cu^{1+} , genera un que la solución adopte un color violáceo, que es más intenso de acuerdo a si hay una mayor concentración proteica, por lo que la detección se realiza por colorimetría. Esto permite, por medio del uso de un espectrofotómetro, medir la absorción a 562 nm, lo cual sería un indicador de la concentración proteica. Luego, se realiza una curva de calibración con una proteína estándar (BSA – ver tabla más abajo) de concentración conocida, en la cual se grafica la absorción en nivel de la concentración. A partir de la ecuación que surge de la recta de dicha curva, se infiere la concentración de proteínas en la muestra problema.

| 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 |

Para esto se procedió a realizar una dilución mínima de 1:10 tanto del extracto proteico, como del buffer de extracción (el cual fue utilizado como blanco) en H₂O y se cargaron 25 µL de la muestra y de cada concentración de BSA, en triplicado en una placa de 96 pocillos. A cada uno se le agregó 200 µL **Working Reagent***², se agitó durante 30 segundos en agitador orbital y se incubó a 37°C por 30 minutos, cubriendo la placa con aluminio.

Por último, se dejó que la placa alcanzara temperatura ambiente y se procedió a realizar la medida de absorbancia a 562 nm.

*² Preparación Working Reagent (WR):

- Cálculo de volumen necesario: $(N^\circ \text{ puntos curva calibración} - 8 + 1 \text{ blanco} - + N^\circ \text{ muestras problema}) \times (N^\circ \text{ replicas} - 3) \times (\text{Volumen WR x muestra} - 200 \mu\text{L})$
- Preparación: Se tomó el volumen calculado de WR de Reactivo A del kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) y se agregó la 50ava parte de Reactivo B del mismo kit.

4.3.3 SDS-PAGE – Calidad de Extracto

La calidad del extracto proteico fue verificada por medio de SDS-PAGE al 12%*³. En esta oportunidad se sembraron 50 µg de proteína y el gel fue revelado utilizando Azul de Coomassie*³.

*³ Soluciones:

- Gel de separación

| <u>SOLUCIONES STOCK</u> | <u>[]f de Acrilamida (12%)</u> |
|---------------------------|---------------------------------|
| Acrilamida/Bis-acrilamida | 3,00 mL |
| 4X Tris-Cl/SDS pH 8,8 | 1,875 mL |
| H ₂ O mQ | 2,625 mL |
| Persulfato de Amonio 10% | 25 µL |
| TEMED | 5 µL |

- Gel de Stacking

| <u>SOLUCIONES STOCK</u> | <u>[]f de Acrilamida (12%)</u> |
|---------------------------|---------------------------------|
| Acrilamida/Bis-acrilamida | 325 µL |
| 4X Tris-Cl/SDS pH 6,8 | 625 µL |
| H ₂ O mQ | 1,525 mL |
| Persulfato de Amonio 10% | 12,5 µL |
| TEMED | 2,5 µL |

- 4X Tris-Cl/SDS pH 8,8 (1,5 M Tris-Cl conteniendo 0,4% SDS)

| | | | |
|------------------|--------|--------|---------------------------------|
| Tris-Base | 45,5 g | 91,0 g | Ajustar pH a 8,8 con HCl 10,2 N |
| SDS | 1,0 g | 2,0 g | Agregar agua para ajustar el |
| H ₂ O | 150 mL | 300 mL | volumen a : |
| | 250 mL | 500 mL | |

- 4X Tris-Cl/SDS pH 6,8 (0,5 M Tris-Cl conteniendo 0,4% SDS)

| | | | | |
|------------------|--------|--------|--------|---------------------------------|
| Tris-Base | 6,05 g | 15,1 g | 30,2 g | Ajustar pH a 6,8 con HCl 10,2 N |
| SDS | 0,4 g | 1,0 g | 2,0 g | Agregar agua para ajustar el |
| H ₂ O | 40 mL | 100 mL | 200 mL | volumen a : |
| | 100 mL | 250 mL | 500 mL | |

- ACRILAMIDA STOCK (se guarda a 4°C)

| | |
|---|---------------|
| ACRILAMIDA | 60 g (30%) |
| BIS-ACRILAMIDA | 1,6 g (0,8 %) |
| H ₂ O mQ c.s.p | 200 mL |
| se filtra con quitasato (filtros milipor 0,45 µm) | |

- PSA 10% (se guarda a -20°)

| | |
|---------------------------|-------|
| PSA | 1 g |
| H ₂ O mQ c.s.p | 10 mL |

- 4X SDS/SAMPLE BUFFER

| | |
|------------------------|--------|
| Tris-Base | 1,52 g |
| Glicerol | 20 mL |
| SDS | 2 g |
| β-MERCAPTOETANOL | 2,0 mL |
| Azul de Bromofenol | 1 mg |
| H ₂ O c.s.p | 50 mL |

- SDS Electroforesis Buffer (se guarda T ambiente)

| | | | |
|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| | <u>5X</u> | <u>5X</u> | <u>5X</u> |
| TRIS BASE | 75,5 g | 30,2 g | 15,1 g |
| Glicina | 365 g | 144,2 g | 72,4 g |
| SDS | 25 g | 10 g | 5 g |
| H ₂ O mQ | <u>5000 mL</u> | <u>2000 mL</u> | <u>1000mL</u> |

Super Azul de Coomasie (1 lt) (se guarda a T ambiente)

| | | |
|---------------------------|-------|--------|
| Coomasie blue R | 0,2 % | 2 g |
| Etanol puro | 30 % | 300 mL |
| Ácido acético. | 7 % | 70 mL |
| H ₂ O mQ c.s.p | | 1 lt |

Decolorante (2 lt) (se guarda a T ambiente)

| | | |
|---------------------|------|---------|
| Etanol puro | 30 % | 600 mL |
| Ácido acético | 7 % | 140 mL |
| H ₂ O mQ | | 1260 mL |

4.3.4. SDS-PAGE – Western Blot

Una vez extraídas las proteínas, cuantificadas y evaluada la calidad de la extracción, se procedió con el Western Blot propiamente dicho.

Para ello, se mezcló una alícuota del extracto proteico con **SDS Loading Buffer**^{*4} y se incubó a 37°C por 15 minutos. Se cargaron 50 µg del extracto total en un pocillo y 5 µL de Marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder (MaestroGen) en otro (ambos por duplicado). Se corrió en un gel **SDS-PAGE al 10%** hasta que el Azul de Bromofenol del **Buffer de Carga**^{*4} estuviera por salir del gel.

4.3.5 Transferencia

Al finalizar el SDS-PAGE, se midieron las dimensiones del gel, se le hizo un corte de referencia y se paso a un recipiente con **Buffer de Transferencia (con SDS) frío**^{*4}. Se cortó un pedazo de membrana del tamaño del gel, con el corte de referencia y 12 hojas de papel Whatmann un poco más grandes que la membrana, agrupadas de a 6. Se sumergió todo en **Buffer de Transferencia**^{*4} (**con SDS**) **frío**. Se armó el dispositivo de transferencia y se transfirió por 1 hora a 120 V.

4.3.6. Stripping

Finalizada la transferencia, se remojó unos segundos la membrana en H₂O mRo, se puso en un recipiente con **Stripping Buffer**^{*4} y se incubó por 30 min a 55-60 °C en horno de hibridación (con leve agitación). Luego, se remojó unos segundos la membrana en H₂O mRo y se colocó en un

recipiente con **Stripping Buffer**. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en **TBST**^{*4} y se dejó la membrana *overnight* en la heladera en 50 mL de **Solución de Bloqueo**^{*4}.

Este paso antes del revelado, genera que el epítoto quede más expuesto y mejora el resultado general de la detección por los anticuerpos.

4.3.7. Revelado

Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios (dilución 1:1000 en **Solución de Bloqueo**) durante 2 horas con agitación, a temperatura ambiente, en 5mL de **TBST** en un tubo Falcon de 50 mL. Una de las membranas se mantuvo como control de carga y el anticuerpo utilizado para la misma fue el comercial Anti-Actin, Mouse Monoclonal Antibody (Clone C4) (MP Biomedicals), el cual es contra la proteína actina. Para detectar el tag HA, se utilizó el anticuerpo comercial Anti-HA.11 Epitope Tag Antibody (Biolegend®).

Luego de la incubación, se hicieron 5 lavados de 5 min con **TBST** y agitación. Posteriormente, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti ratón (dilución 1:1000 en **Solución de Bloqueo**) durante 2 horas y se realizaron 5 lavados de 5 min con **TBST** y agitación. Por último, se reveló con kit de revelado en el G-BOX.

*4 Soluciones

- SDS Loading Buffer (4X) (Buffer de Carga):

- 250 mM Tris-HCl 6.8
- 12% SDS
- 40 % Glycerol
- 20 % β -mercaptoetanol (se le agrega a la alícuota).
- 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, se agrega 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 μ L 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.

4.4 Diseño de Cebadores

4.4.1 Fusión-PCR

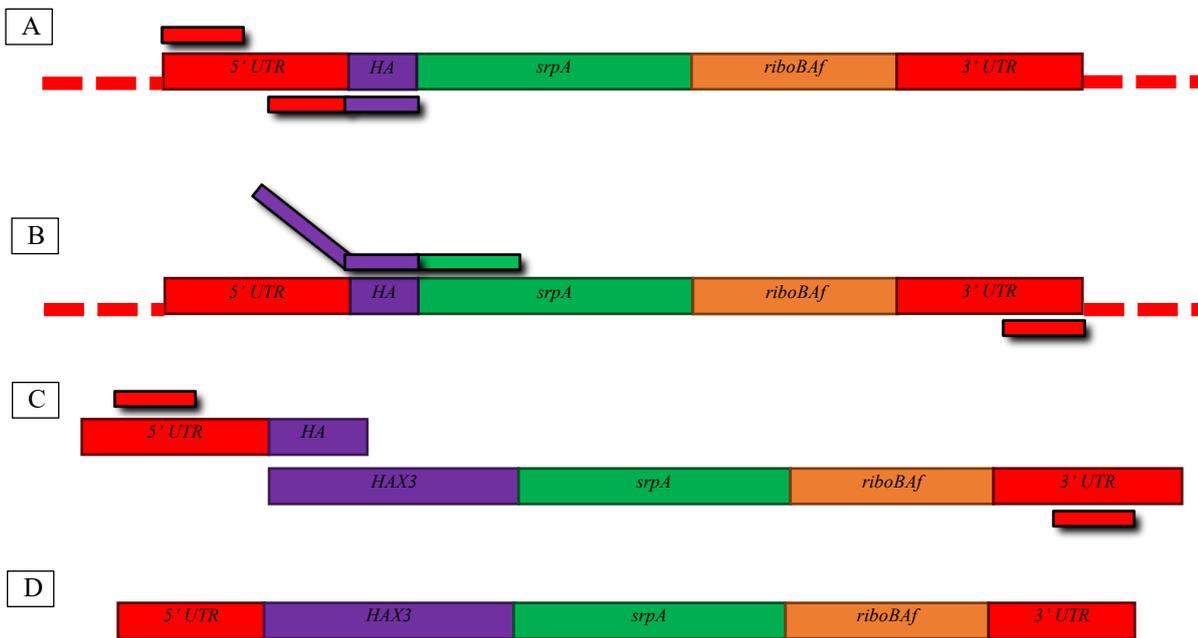


Figura 6. Representación gráfica del diseño de cebadores y generación de los fragmentos necesarios para la técnica Fusion-PCR. A) Representación de los cebadores utilizados para la generación del fragmento K. B) Representación de los cebadores utilizados para la generación del fragmento G. C) Representación de los fragmentos solapantes producidos y los cebadores "nested" utilizados para la fusión. D) Representación de la fusión.

La generación de la construcción *3HA-srpA*, fue realizada mediante el uso de la técnica de fusion-PCR [Szewczyk et al., 2006], con la cual es posible realizar construcciones génicas de forma relativamente sencilla. Brevemente, la técnica se basa en la utilización de ADN genómico del organismo que se desea modificar y 3 pares de cebadores. Con los primeros dos pares, se busca generar dos fragmentos solapantes de DNA. Uno (o ambos) contendrá(n) la modificación genética de interés. Esta puede ser o bien una mutación puntual, una delección o (como lo es en el caso de el presente trabajo) una adición de nucleótidos. El diseño de estos pares cebadores debe hacerse de forma que: 1) al menos uno de ellos introduzca la mutación de interés y 2) que un extremo de uno de los fragmentos sea complementario a un extremo del otro (solapantes). Por último, el tercer par de cebadores, cumple la función de fusionar estos fragmentos en uno solo y es recomendable que sean "nested", es decir, que hibriden con una zona interna en los extremos opuestos de cada uno de los fragmentos. De esta forma se genera un *cassette* casi idéntico en secuencia a la región genómica problema, pero portando la mutación deseada.

Con el set de primers diseñados para este trabajo, se generaron fragmentos solapantes conteniendo, uno de ellos la secuencia 5'UTR de *srpA*, más la secuencia que codifica para un HA en 3' (fragmento **K**) y el segundo de los 3 repetidos de HA en 5', seguido por la secuencia codificante para *srpA*, el gen *riboB* (como marcador de selección) y gran parte de la 3'UTR de *srpA* (fragmento **G**) (figura 6).

De esta forma, ambos fragmentos solapan en una secuencia codificante para HA. El tercer par de cebadores, encargados de realizar la fusión propiamente dicha, fue diseñado de forma que el forward hibridara con una zona interna de la región 5'UTR de *srpA* en el primer fragmento

amplificado y el reverse contra una zona interna de la región *3'UTR* en el segundo. Se buscó obtener, entonces, una construcción de DNA idéntica en secuencia a la región genómica donde se encuentra el gen para *srpA*, pero con una inserción de 3 repetidos para HA, entre el final de la *5'UTR* y el inicio de la secuencia codificante de *srpA* (**figura 6**).

4.4.2 PCR colonia

Para realizar un rápido *screening* de todos los transformantes obtenidos, se recurrió a la técnica PCR colonia (ver **sección 4.6.2**). Para el diseño de los cebadores, se buscó que la reacción de amplificación pudiera demostrar de forma indirecta, si la cepa analizada había incorporado el triple tag HA. Para ello, se diseñó uno de los cebadores de modo que estuviera compuesto por el final de la secuencia para HA en su 5' y el inicio en su 3'. Así, hibridaría en medio de dos secuencias consecutivas del péptido HA (**Figura 7**). De esta forma, sólo se obtendría un producto de amplificación si en el genoma de la cepa analizada, hubiera 2 secuencias consecutivas para HA.



Figura 7. Representación gráfica las regiones donde hibridarían los cebadores utilizados para la reacción de PCR colonia, en la construcción génica generada. El cebador que hibridaría contra el final y el inicio de una secuencia HA, está representado doble, ya que podría hibridar tanto entre el primer y segundo repetido, como entre el segundo y el tercer repetido HA.

4.5 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ADN se hicieron crecer las cepas en MC con 3% agar (para simplificar la colección de esporas y que en el proceso no se raspe agar). Las esporas colectadas por cada placa fueron suspendidas en 7,5 mL de 0,01% Tween® 80 (Sigma-Aldrich) e inoculadas en 200 mL de MM líquido con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno y el suplemento ribo (ya que las cepas en cuestión tienen mutado el gen *riboB*, lo cual genera que no puedan sintetizar la vitamina por ellas mismas – ver **TablaAnexo.1, en sección A3**). La suspensión en detergente es debido a que las esporas son altamente hidrofóbicas y, por lo tanto, insolubles en agua.

Se incubaron “*overnight*” a 37°C y a 140 r.p.m. Se filtró el micelio crecido por medio de filtros blutex y se lavo con agua estéril. Luego de secar el micelio entre hojas de papel, se procedió con el lisado celular, utilizando nitrógeno líquido y un mortero hasta obtener un polvo blanco. Se agregaron 800 µL de **Solución de Extracción de ADN***⁵ por cada 200 mg de micelio molido y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se continuó con la extracción de ADN utilizando una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se vortexeó bien y centrifugó a 11.600g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa y se agregó un mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se vortexó y centrifugó a 11.600g por 10 minutos a

temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% en presencia de 0.3 M de Acetato de Sodio (AcNa). Se incubó por 30-60 min a -20°C y se centrifugó por 10 minutos a 11.600g. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 1 mL EtOH 70%, con centrifugación a 11.600g por 5 minutos, de por medio, descartando el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado debajo de una lampara por 10 minutos y se resuspendió en 50-100 µL de **Buffer Tris-EDTA 10-1**^{*5} (suplementado con RNAsa a una concentración final de 10 µg/mL). Finalmente se incubó por 1 hora en baño de agua a 37 °C.

***5 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.

3.6 Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para todas las reacciones de PCR se utilizó el termociclador Eppendorf Mastercycler® DNA Engine Thermal Cyclers PCR.

4.6.1 Fusion-PCR

Partiendo del ADN genómico de la cepa MVD 425, que se extrajo según explicado en la **sección 4.5**, se realizaron dos reacciones de PCR, buscando generar los dos fragmentos descritos más arriba. A saber, en la primera reacción se utilizaron los cebadores HAsrp-Rv y srp54-Fw (ver secuencias en **sección A1**), buscando generar un fragmento de DNA de 1500 pb aproximadamente, que contuviera la 5'UTR de *srpA* y una copia del tag HA (fragmento K). En la segunda reacción se utilizó el par srp54-3Rv y HAX3-srpA-Fw, a modo de generar un fragmento de 5000 pb aproximadamente, que contuviera los 3 repetidos del tag HA, la secuencia codificante de los genes *riboB* y *srpA*, seguida de un fragmento de la 3'UTR de *SrpA* (fragmento G). La enzima polimerasa utilizada fue la Kapa-HiFi (BioSystems).

Reacción PCR (volumen total 25µl):

5µl Buffer 5X (específico para KAPA-HiFi, provisto por fabricante)

0,75µl dNTPs [10mM]

0,75µl Cebador Rv [10µM]

0,75µl Cebador Fw [10µM]

1 µl ADN molde [0,27 µg/µl]

0,5 µl KAPA-HiFi [1 U/µl]

16,25 µl H₂O

Programa:

T₁ 95°C 2'
 X 25 { T₂ 98°C 20"
 T₃ T_m 15"
 T₄ 72°C t_e
 T₅ 72°C 5'

T_m – temperatura de annealing.

t_e – tiempo de extensión.

Ambos valores fueron modificados en cada caso, según características del fragmento a amplificar.

Para el fragmento K: 61°C y 1'30", respectivamente.

Para el G: 63°C y 5', respectivamente (sobre la elección de esta temperatura se discutirá en el apartado de **Resultados y Discusión**).

Para la fusión de los fragmentos, se utilizaron los primers *nested srp54-5N-Fw* y *srp54-3N-Rv*, que hibridan con regiones internas del 5'UTR y el 3'UTR, respectivamente. La reacción de PCR utilizada fue esencialmente la misma que para la generación de los fragmentos, pero utilizando a éstos como DNA molde en una concentración de entre 30 y 50ng.

Reacción fusión-PCR (volumen total 25µl):

5µl Buffer 5X (específico para KAPA-HiFi, provisto por fabricante)

0,75µl dNTPs [10mM]

1µl Cebador Rv [10µM]

1µl Cebador Fw [10µM]

x µl ADN molde fragmento 1 } Volúmen variable, de acuerdo a la concentración resultante de la amplificación del
 x µl ADN molde fragmento 2 } fragmento, buscando poner entre 30 y 50 ng de cada uno.

0,5 µl KAPA-HiFi [1 U/µl]

csp 25µl H₂O

Programa:

T₁ 95°C 2'
 X 10 { T₂ 98°C 20"
 T₃ 65°C 15"
 T₄ 72°C 7'
 X 15 { T₂ 98°C 20"
 T₃ 65°C 15"
 T₄ 72°C 7'
 T₅ 72°C 5'

T₄ – tiempo de extensión. Depende del largo del fragmento a amplificar. En esta oportunidad, 7 kb aproximadamente (1,5 kb fragmento 1(K) + 5 kb fragmento 2 (G)). En la segunda repetición de 15 ciclos, el tiempo en T₄, va aumentando de 20" por ciclo.

4.6.3 PCR para secuenciación

En este caso los cebadores utilizados fueron *srp54-5N-Fw* y *srpA-RiboAf-Rv* (ver secuencia en **sección A1**). Estos flanquearían la región en donde estarían los tres repetidos del tag HA insertos, en caso de que la transformación hubiese sido exitosa (ver **sección 4.10**).

Reacción PCR (volumen total 25µl):

5µl Buffer 5X (específico para KAPA-HiFi, provisto por fabricante)

0,75µl dNTPs [10mM]

0,75µl Cebador Rv [10µM]

0,75µl Cebador Fw [10µM]

5 µl ADN molde [0,88 µg/µl]

0,5 µl KAPA-HiFi [1 U/µl]

12,25 µl H₂O

se hace un mix único, que luego se separa en todas las reacciones que se piensan hacer, teniendo en cuenta que, por cada una, deben haber 50 µl totales.

Programa:

T₁ 95°C 2'
 X 25 { T₂ 98°C 20"
 T₃ 61°C 15"
 T₄ 72°C 3'
 T₅ 72°C 5'

Dado que el fragmento a amplificar, sería de 3kb, se determinó el tiempo de extensión en 3 minutos

4.6.2 PCR colonia

Partiendo de colonias de transformantes (ver **sección 4.10**) aisladas en placas de agar 1,3%, se utilizaron sus esporas como base para realizar la amplificación del fragmento genómico deseado. Esta técnica permite hacer una rápida detección de el éxito o fracaso de la transformación, sin previo paso de extracción de ácidos nucleicos, partiendo del supuesto de que las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso, serán suficientes para lisar las células, liberar el ADN y dejarlo accesible a la polimerasa. La enzima utilizada para este ensayo fue la *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN), junto con los buffers CoralLoad PCR buffer 10X y PCR buffer 10X, incluidos en el Kit por el fabricante. Los cebadores utilizados para esta reacción fueron los HAx3_Fw y SrpA1_Rv (ver secuencias en **sección A1**) que, como se comentó en la **sección 4.4.2**, el primero hibridaría justo en el medio entre 2 secuencias de HA y el segundo contra una región interna a los inicios de la secuencia codificante para SrpA. De esta forma, habría amplificación sólo si la cepa contiene al menos 2 repetidos consecutivos de HA. En aquellos transformantes que dieran un resultado positivo para esta técnica, se procedería a amplificar la región genómica deseada y se enviaría a secuenciar, tal como descrito en la **sección 4.6.3**, a modo de corroborar la presencia de los 3 tags HA.

Reacción PCR:

5µl PCR Buffer 10X

1µl dNTPs [10mM]

1,5µl Cebador Rv [10µM]

1,5µl Cebador Fw [10µM]

5 µl CoralLoad PCR Buffer 10X

0,25 µl Taq DNA polymerase [5 U/µl]

36 µl H₂O

Programa PCR:

T₁ 94°C 15'

X 30 {

T₂ 94°C 30"

T₃ 55°C 30"

T₄ 72°C 30"

T₅ 72°C 5'

T₄– tiempo de extensión. Depende del largo del fragmento a amplificar. En esta oportunidad alrededor de 400 kb.

4.7 Purificación de ADN

Para la purificación de los productos de PCR se utilizaron dos métodos:

- Purificación directa – El mismo producto de la reacción de amplificación fue purificado mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific™). El mismo fue utilizado en los casos en que de la amplificación se obtuvo un producto único que, en gel de agarosa, se visualizó como una banda única, a la altura esperada, según el tamaño previsto.
- Purificación en gel de agarosa – A partir de una banda en gel de agarosa, se escinde del mismo y se procede a la purificación posterior a disolver el polímero, para quedarse sólo con ácidos nucleicos. Se utilizó el kit comercial Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs® inc.). Este fue utilizado en los casos en que la amplificación rendía más de un producto del deseado,

visualizado como varias bandas en un gel de agarosa de pesos alejados a lo esperado, junto con bandas que sí migraban a la altura esperada.

4.8 Visualización de ADN

Para los productos de extracciones, purificación de ADN y reacciones de PCR, se utilizó la técnica de visualización por gel de agarosa al 1% u 0,8% (dependiendo el tamaño del fragmento de DNA a resolver), con **TAE 1X**^{*6} como buffer de corrida. Un menor porcentaje de agarosa deriva en una red de polímeros más “relajada”, donde los poros generados en el material, son de mayor tamaño. Esto permite una adecuada resolución para extensos fragmentos de ADN. Por este motivo, los geles de 0,8% fueron utilizados para resolver los fragmentos resultantes de la fusión, que presuntamente serían de un gran tamaño molecular (~ 6,5 Kb). Como marcador de peso molecular, se utilizó el GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™). En la mayoría de los casos se utilizó el **Buffer de Carga**^{*6}, excepto a la hora de visualizar los resultados de la PCR colonia (ver **sección 4.6.2**), que pueden ser cargados directamente en el gel, por contener el CoralLoad PCR Buffer en el mix de la reacción de PCR. Los geles fueron suplementados con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific™), como tinta que permite la visualización del DNA bajo luz ultravioleta.

***6 Soluciones:**

- TAE 50X (en H₂O):

Tris Base 2M

Ácido acético glacial 1M

EDTA 0,05 M pH 8,0

Se guarda stock a 50X y se diluye en agua miliRO para llevar a 1X, al momento de usarse.

- Buffer de carga ADN (6X):

30% (v/v) glycerol.

0,25% (w/v) bromophenol blue.

0,25% (w/v) xylene cyanol

4.9 Cuantificación de ADN

Todas las cuantificaciones se realizaron por medio del espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

4.10 Transformación

La construcción descrita en el apartado **4.6.1 Fusion PCR**, fue utilizada para transformar cepas de *A. nidulans* buscando que, por recombinación homóloga, se sustituya la región del genoma de interés (**Figura 8**). Esto se ve facilitado puesto que el hongo presenta una alta tasa de doble recombinación y además, las cepas utilizadas en el laboratorio, portan una delección del gen *nkuA*, el cual es esencial en el proceso de recombinación no homóloga y, por tanto, se minimiza la frecuencia de este tipo de recombinación [Nayak et al. 2005]. Las cepas utilizadas para la transformación fueron la MVD 10A (cepa salvaje para *UreA* - *wt*) y la MVD 2425 (que porta la mutación de sustitución sinónima en las posiciones 24 y 25 del gen para *UreA* – *ureA*₂₄₂₅), ambas portando una mutación de pérdida de función del gen *riboB* (ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**). Este gen está involucrado en la biosíntesis de riboflavina (Vitamina B2), esencial para el crecimiento de *A. nidulans* y, tal como se especificó más arriba, en la construcción generada, se encontraría la

secuencia del gen ortólogo de la especie *A. fumigatus* (usando como marcadores de selección genes de otra especie, se evita la recombinación homóloga en otro locus que no sea el deseado). Siendo así, solo podrían crecer en medio sin dicha vitamina aquellas cepas que hubiesen incorporado el fragmento y entonces sean capaces de sintetizarla por ellas mismas.

4.10.1 Generación de Protoplastos

Para la transformación, el paso inicial consta de generar células que sean competentes para incorporar la molécula de DNA que deseamos transformar. Para ello, debemos quitar del camino el primer impedimento, que es la pared celular del hongo. Siendo así, se comenzó inoculando 2 placas de MC agar 3%, suplementado con riboflavina, de cada una de las cepas (*wt* y *ureA₂₄₂₅*). Se dejaron



Figura 8. Representación esquemática de la inserción por recombinación homóloga en el locus de *srpA*. Arriba, representación de la región genómica en la cepa receptora. Abajo, la construcción genómica generada por medio de la técnica fusión PCR. Las líneas rojas que conectan los 5' y 3' UTRs representan los eventos de recombinación homóloga esperados.

crecer 24 hrs en estufa a 37°C, se rasparon las esporas y se realizó una suspensión de las mismas en 15 mL de Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,01%. Luego se inocularon 400 mL de MM líquido con los suplementos correspondientes (*ribo* y *pyro* – ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**), con la suspensión de esporas y dejó crecer *overnight* a 25°C con agitación a 140 r.p.m. El micelio fue filtrado utilizando filtros blutex, lavado con agua estéril, secado ligeramente entre hojas de papel y pesado en tubos falcon estériles, buscando alcanzar los 2,5g aprox. por tubo. Se suspendió el micelio en **Solución B^{*7}** a razón de 10 mL/gr de micelio, vortexeando o pipeteando bien, prestando atención a que quedara un aspecto homogéneo, sin cúmulos de micelio, para favorecer la acción de las enzimas. En un matraz estéril, se volcó la solución de micelio y se agregaron 300 mg/g de micelio, de las enzimas comerciales digestoras de la pared celular GLUCANEX[®] (Sigma-Aldrich), junto con albúmina de suero bovino (BSA), a razón de 3-7mgr/gr de micelio, en 2 partes. Luego de la primera adición de enzimas digestivas y BSA, se incubó el matríz a 30°C con agitación (100 r.p.m). En este paso la intención es generar células sin pared celular, denominadas protoplastos. De esta forma el hongo es más permeable al ingreso de moléculas, como la construcción de ADN que pretendíamos incorporar en su genoma. A la vez, esto lo hace más delicado y propenso a la lisis mecánica o por ósmosis, por lo que la manipulación a partir de este paso, debe ser delicada. Al cabo de una hora y media de incubación, se observó al microscópio, esperando ver células separadas entre sí y de aspecto redondeado (protoplastos), se agregó la segunda parte de la enzimas digestivas y se volvió a incubar con agitación a 30°C por una hora más. Una vez alcanzado el nivel de digestión suficiente como para contar con una buena cantidad de protoplastos, se procedió a realizar el paso de centrifugación, en el cual se pretende que los

protoplastos queden concentrados en la interfase de entre soluciones, para recuperarlos. El contenido del matraz fue trasvasado a tubos Corex[®] estériles de 30 mL, se vortexeó suavemente y se agregó un volumen igual de **Solución D**^{*7}, buscando hacerlo de forma lenta y contra la pared del tubo. La centrifugación fue realizada a 14°C, durante 10 minutos a 6000 r.p.m. en centrífuga Becker con rotor vasculante. Este último se utiliza para que la capa de protoplastos quede dispuesta horizontalmente y no concentrada en la pared del tubo que queda más externa del centro de centrifugación. A partir de este momento, se trabaja siempre en frío (cuando los tubos no están en la centrífuga, se mantienen en hielo). Los protoplastos formando una capa blanca en la interfase, fueron recuperados por medio del uso de pipetas Pasteur y transferidos a nuevos tubos Corex[®] estériles. Se agregaron 5-10mL de **Solución E**^{*7} y se volvió a centrifugar a 14°C, durante 10 minutos a 4000 r.p.m. en rotor vasculante. Se descartó el sobre nadante y los protoplastos fueron resuspendidos en 5 mL de **Solución G**^{*7} y se repitió el paso de centrifugación a 14°C, durante 10 minutos a 6000 r.p.m. Antes de comenzar con esta centrifugación, se tomo una pequeña alícuota de la suspensión para realizar un cálculo de la concentración de protoplastos, utilizando una cámara Neubauer, por medio de la observación a microscópio de luz. Al finalizar la centrifugación, se descartó el sobrenadante y los protoplastos fueron re-suspendidos en una cantidad suficiente de **Solución G**, como para alcanzar una concentración de 5×10^7 protoplastos/100 μ L.

4.10.2 Transformación

En este paso, se buscó que los protoplastos generados en la instancia anterior, incorporaran la construcción génica generada en el paso **4.6.1 Fusion-PCR**. Para ello, se transfirieron 100 μ L de la suspensión de protoplastos a tubos Eppendorf. A una porción de dichos tubos se les agregó ~ 15 μ L de ADN (no menos de 250 ng totales) de la construcción generada y otros se mantuvieron como control negativo: se les realizó exactamente el mismo tratamiento, pero no se les agregó ADN en este paso. Se vortexearon a máxima velocidad 6-8 veces durante 1 segundo cada vez, en pos de mezclar homogéneamente el ADN en la suspensión. Se agregaron 50 μ L de **Solución PEG**^{*7} recién filtrada y a temperatura ambiente en cada tubo. Se volvió a vortexear a máxima velocidad durante 1 segundo 3-4 veces más y se colocó en hielo durante 25 minutos. Se agregó 1 mL más de **Solución PEG**, se mezcló suavemente con micropipeta, tomando y soltando cierto volumen de la suspensión, unas 10 veces y se dejó 25 minutos a temperatura ambiente. Se inocularon ~150 μ L de la mezcla resultante, con cuidado, en placas de selección de MM agar 1,3% suplementado con 1.0 M sacarosa, amonio y *pyro* (Dado las auxotrofías de las cepas – Ver **TablaAnexo.1**, en **sección A3**). La sacarosa aporta concentraciones altas de solutos en el medio y evita la lisis osmótica de los protoplastos. En este caso no se adiciona *ribo* al medio, dado que queremos que sólo crezcan hongos que hayan incorporado la construcción en su genoma y puedan sintetizar la vitamina por sí mismos. Como control positivo, se inocularon algunos protoplastos con el DNA en placas que, además de los suplementos ya discutidos, sí contenían *ribo*. Estas placas se incubaron en estufa a 37°C con la tapa hacia arriba durante 24 hrs. y luego otras 48 hrs. (o hasta que comience a visualizarse el crecimiento de colonias aisladas) en posición invertida, también a 37°C.

***7 Soluciones de Transformación:**

B:

1,2 M MgSO₄, 10 mM ortofosfato (pH 5,8)

Pesar el MgSO₄, agregar H₃PO₄ 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.

4.10.3 Purificación de los Transformantes

Los micelios de las colonias de transformantes, pueden ser multi-nucleados. Esto significa que una misma colonia puede contener núcleos diferentes, alguno de éstos transformados, pero otros no. Dado que las esporas son uninucleadas, a partir de éstas se pueden purificar colonias también uninucleadas. La importancia de este paso, es “quitar del camino” aquellos núcleos que no contengan el cassette genómico insertado.

En placas de MM agar 1,3% se colocaron los suplementos pertinentes. Tanto MVD 10A y MVD 2425 son *pyroA4* (ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**) y dado, el diseño la transformación, se espera que las colonias transformantes aún mantengan esta auxotrofia. Por tal motivo, debió suplementarse el medio con el compuesto piridoxina y amonio como fuente de nitrógeno.

Se tomaron esporas de colonias de los transformantes resultantes en el paso anterior, eligiendo aquellas que estuvieran lo más aisladas posibles de otras y se hizo una suspensión en una dilución 10⁻⁴ (0,01%) del detergente Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich) (la suspensión en detergente es debido a que las esporas son altamente hidrofóbicas y, por lo tanto, insolubles en agua), buscando que la misma alcance un color verdoso fuerte, para asegurarse de tener una cantidad importante de esporas. A partir de dicha suspensión, se realiza una dilución, 1/200. De ésta se inocula una de las placas con 80µL, se distribuye homogéneamente en toda la placa y se incuba en estufa a 37°C durante 24-48 hrs. Este procedimiento se repitió para 6 colonias transformantes de cada cepa (*wt* y *ureA*₂₄₂₅). En caso de notar que el crecimiento sea muy escaso, se inoculan nuevas placas con una dilución menor de esporas. De notar lo contrario, que hay un crecimiento convergente de colonias, se repite el proceso con una mayor dilución.

4.10.4 Placas para análisis del Fenotipo de las Cepas Transformantes

La intención en este paso es la de corroborar, por medio del crecimiento o no crecimiento de las cepas en distintas condiciones de medio, que los transformantes contienen los marcadores de selección esperados.

Con los transformantes purificados, se realiza una placa madre (MC 1,3% agar + ribo) en la cual se colocan de forma ordenada una selección de réplicas de transformantes (en este trabajo se seleccionaron 4 colonias aisladas resultantes de la purificación anterior), las cepas receptoras (las que se utilizaron para la transformación) y una cepa que oficie de control (Para este caso, como control, se utilizó la cepa MVD 001 (ver **Tabla Anexo.1**, en **sección A3**)). La placa se dejó crecer en estufa a 37°C durante 48hrs.

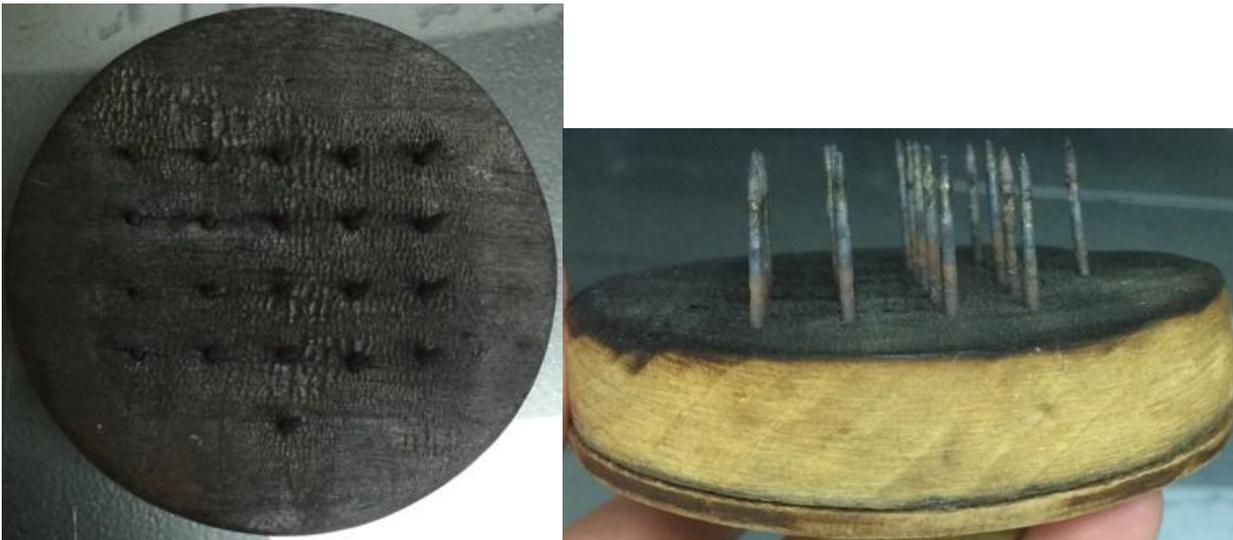


Figura 9. Herramienta utilizada para el picado de esporas de forma colectiva, a la hora de realizar réplicas del mismo patrón de sembrado, en el análisis de fenotipos de las cepas en cuestión.

Posteriormente se prepararon placas de MM 1,3% agar donde se omite la adición de suplementos uno a uno: una placa con todos los suplementos (NH₄, ribo, pyro, paba), otra sin ribo (NH₄, - , pyro, paba), otra sin pyro (NH₄, ribo, - , paba) y una última sin paba (NH₄, ribo, pyro, -).

A partir de la placa madre generada (en la cual se espera que todas las cepas inoculadas crezcan por igual), se hacen réplicas en las placas de MM descritas en el párrafo anterior, por medio de la utilización de una herramienta generada en el laboratorio, que permite tomar esporas de todas las cepas a la vez (**figura 9**).

4.11 Secuenciación

Para verificar que los transformantes purificados y que respondieron positivamente a las pruebas de fenotipo en los pasos anteriores, hayan incorporado efectivamente el fragmento deseado, que no hubiese ocurrido ninguna mutación extra en dicha región y que el marco de lectura de los tres repetidos del tag HA se mantenga en fase con el de la secuencia codificante de *srpA*, se amplificó la zona en cuestión y se mandó a secuenciar a Macrogen (Corea).

Se seleccionaron 2 transformantes al azar y, luego de la extracción de ADN (ver **sección 4.5**), se amplificó la región del cassette génico utilizando los primers Srp54-5N-Fw y srpA-RiboAf-Rv (ver **sección 4.6.3** y secuencias en **sección A1**). Esta región incluiría un fragmento de la 5'UTR de *srpA*, los 3 repetidos HA, la secuencia codificante de *srpA* y el inicio de la secuencia codificante de *riboBAf*.

Por pedido de la empresa, la muestra a secuenciar debe estar a 10ng/100pb, en por lo menos 20ng/ μ l; dado que nuestro fragmento era de \sim 3000 pb, debía haber una cantidad de ADN de 300 ng. Los productos de PCR fueron purificados por gel (ver **sección 4.7**), cuantificados (ver **sección 4.9**) y diluïdos siguiendo estos requisitos.

4.12 Análisis de Secuencias

Las secuencias recibidas de Macrogen, fueron analizadas a través del software MEGAX (Kumar et al. 2018), por medio de alineamientos contra la secuencia de la región genómica de *A. nidulans* de interés.

5. Resultados y Discusión

5.1 Caracterización Cepa de Partida

Como ensayo preliminar, se propuso realizar un western blot sobre la cepa que se utilizaría para realizar la construcción explicada en la **sección 4.4.1**, con el fin de verificar si contenía el tag HA y a modo de probar el anticuerpo que luego se usaría para la inmunoprecipitación. En la **figura 10** se

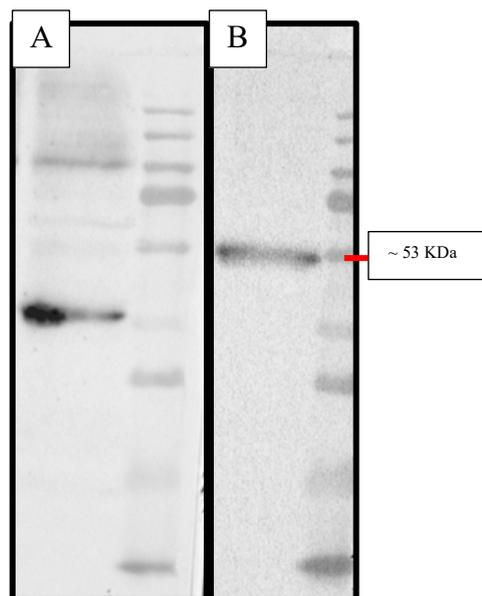


Figura 10. Resultados del revelado de Western Blot. A) Anticuerpo primario α -actina B) Anticuerpo primario α -HA.

muestra el resultado de dicho ensayo y podemos observar que el mismo se dio de forma exitosa, ya que se visualizó una banda a la altura del peso molecular esperado para la fusión de HA::SrpA (**Figura 10**, panel de la derecha). Como control, se utilizó la proteína β -actina, para la cual también se obtuvo un resultado positivo. (**Figura 10**, panel de la izquierda).

5.2 Generación de Construcción Génica

La técnica de fusión-PCR fue la elegida para llevar a cabo la generación de la construcción *3HA-srpA*, lo que constituye el primer objetivo de esta tesis. Tal como fue explicado en Materiales y Métodos, el paso inicial de esta técnica consiste en generar dos fragmentos de DNA solapantes, efectuando dos PCR independientes, a partir del genoma de *A. nidulans* (por detalles ver **secciones 4.4 y 4.6.1**). El diseño de cebadores para esta técnica fue llevado a cabo de forma que uno de ellos contuviera los tres repetidos de la secuencia para HA, seguidos de la secuencia codificante para SrpA (ver secuencias de los cebadores en **sección A1**) y de esta forma lograr insertar dichos repetidos entre la *5'UTR* y la secuencia codificante para *srpA*. En la **figura 6** se muestra una representación esquemática de los fragmentos que generados durante esta instancia y el diseño de los cebadores.

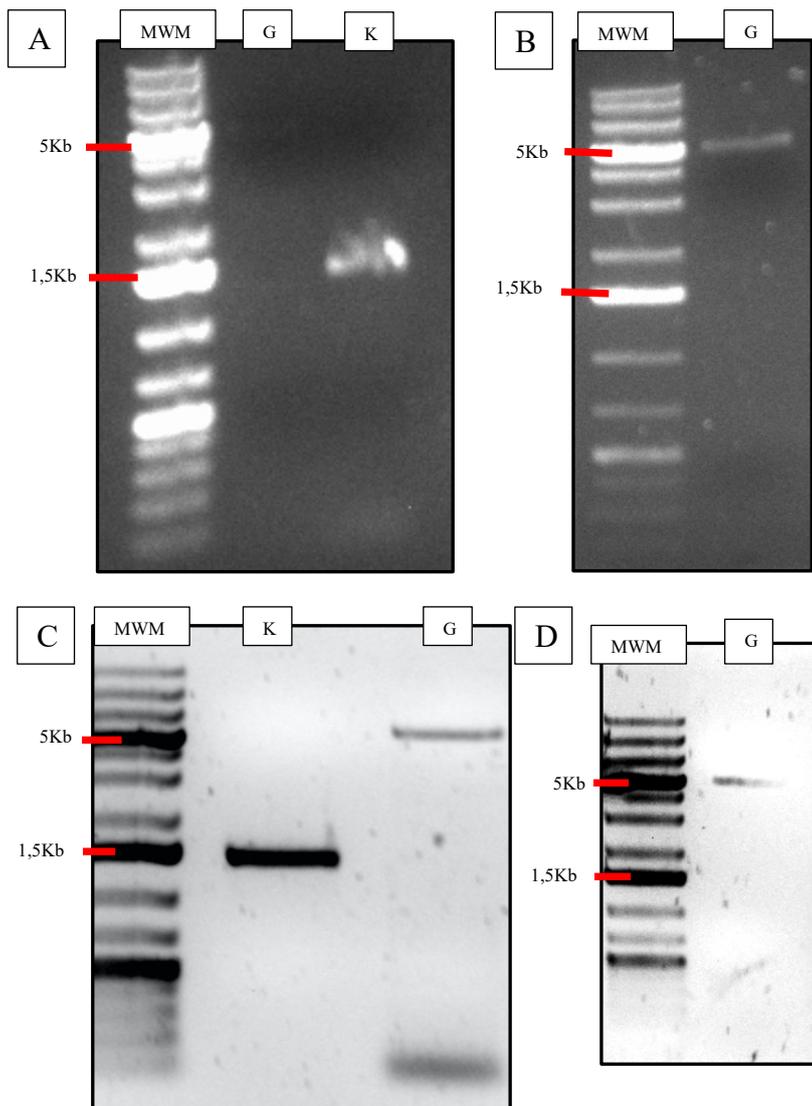


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1%, mostrando los resultados preliminares de las reacciones de PCR para generar los fragmentos K y G. A) Primera ronda de amplificación. B) Repetición para el fragmento G, modificando el programa de termociclado. C) Resultado de las purificaciones directas de los productos de PCR. D) Purificación por escisión de gel del fragmento G

Los resultados de la primera amplificación fueron analizados por medio de una corrida electroforética en gel de agarosa 1%. En la **figura 11.A**, puede observarse que se obtuvo una buena amplificación para el fragmento más pequeño (K, ~1,5 kb), pero casi no puede advertirse señal en el carril que correspondería al otro fragmento (G, ~ 5 kb). Esto pudo deberse a un error en los calculos del tamaño previsto para el mismo. Inicialmente se estimó que tendría ~ 3 kb (2 kb menos de lo que realmente tendría, según el tamaño que se especifica más arriba), por lo que en el programa del termociclador, el tiempo de extensión se estableció en 3 minutos. A su vez, la región donde hibridaría el cebador *reverse*, es una zona muy rica en contenido GC, por lo que se hipotetizó que quizás la temperatura de annealing debería aumentarse. Siendo así, en la segunda ronda de amplificación del fragmento G, se modificó el programa, aumentando la temperatura de annealing de 61°C a 63°C y el tiempo de enlongación de 3 minutos a 5 minutos, lo cual tuvo un efecto positivo (**figura 11.B**).

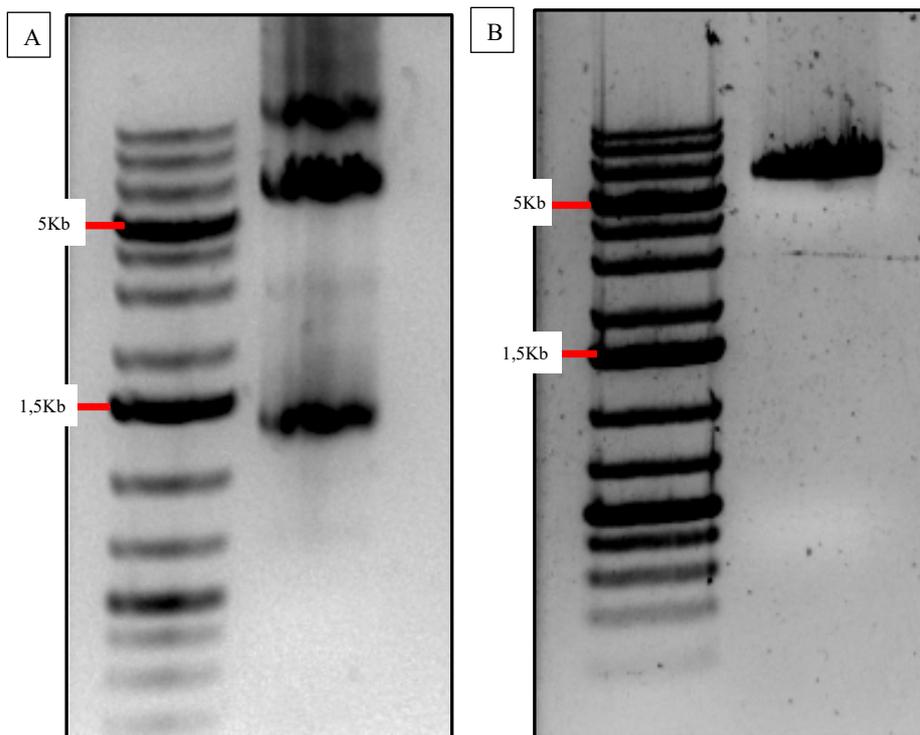


Figura 12. Electroforesis en gel 0,8% agarosa, mostrando los resultados de la fusión de los fragmentos K y G. A) Resultado de la reacción de amplificación c) Resultado de la purificación por gel.

Antes de continuar con el siguiente paso de la técnica, que sería la fusión de estos dos fragmentos solapantes, es necesario purificar los productos de la amplificación, a modo de quitar los cebadores que pudieran haber quedado y que no interfieran en la siguiente etapa. Tal como explicitado en Materiales y Métodos, se utilizó un kit comercial (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Scientific™) para purificar de forma directa los productos de PCR. Para el fragmento K, este paso de purificación fue suficiente (**figura 11.C**), lo que queda evidenciado por la observación de una banda única a la altura del peso esperado, en un gel de agarosa 1%. Empero, al aplicar este mismo protocolo en el fragmento G, pudo constatar la presencia de una segunda banda de peso molecular muy pequeño

(Figura 11.C), no esperada. Se estimó que podía deberse a que uno de los cebadores utilizados para la amplificación de dicho fragmento superaba las 100 pb y este tamaño se encuentra dentro de los límites establecidos por el fabricante para dicho kit. Por este motivo, se procedió a purificar por escisión de banda con otro kit comercial (Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit, New England Bio-Labs[®] inc.), lo cual tuvo un resultado positivo, ya que en gel de agarosa 1%, se observó una sola banda del tamaño esperado, desapareciendo aquella de bajo peso molecular que se veía utilizando el kit de purificación de PCR directa (figura 11.D).

Una vez obtenidos los fragmentos K y G purificados, se procedió con la fusión. Este paso se consideró exitoso, ya que en electroforesis en gel de agarosa 0,8%, pudo visualizarse claramente una banda intensa a la altura esperada (~ 6,5 Kb) (figura 12.A). Debido a que junto con esta banda se aprecian otras 2 de similar intensidad, debió a realizarse una purificación por escisión de banda, de igual forma que se realizó para el fragmento G (figura 12.B). Este paso es importante, puesto que, a la hora de realizar la transformación, debemos contar con la construcción purificada, de modo de hacer el ensayo más eficiente y que el hongo no incorpore elementos génicos que no son los deseados o entorpezcan el proceso.

Todos los pasos descriptos fueron repetidos, con la intención de contar con una gran cantidad de DNA de la construcción, para transformar las dos cepas, MVD 10A y MVD 2425B.

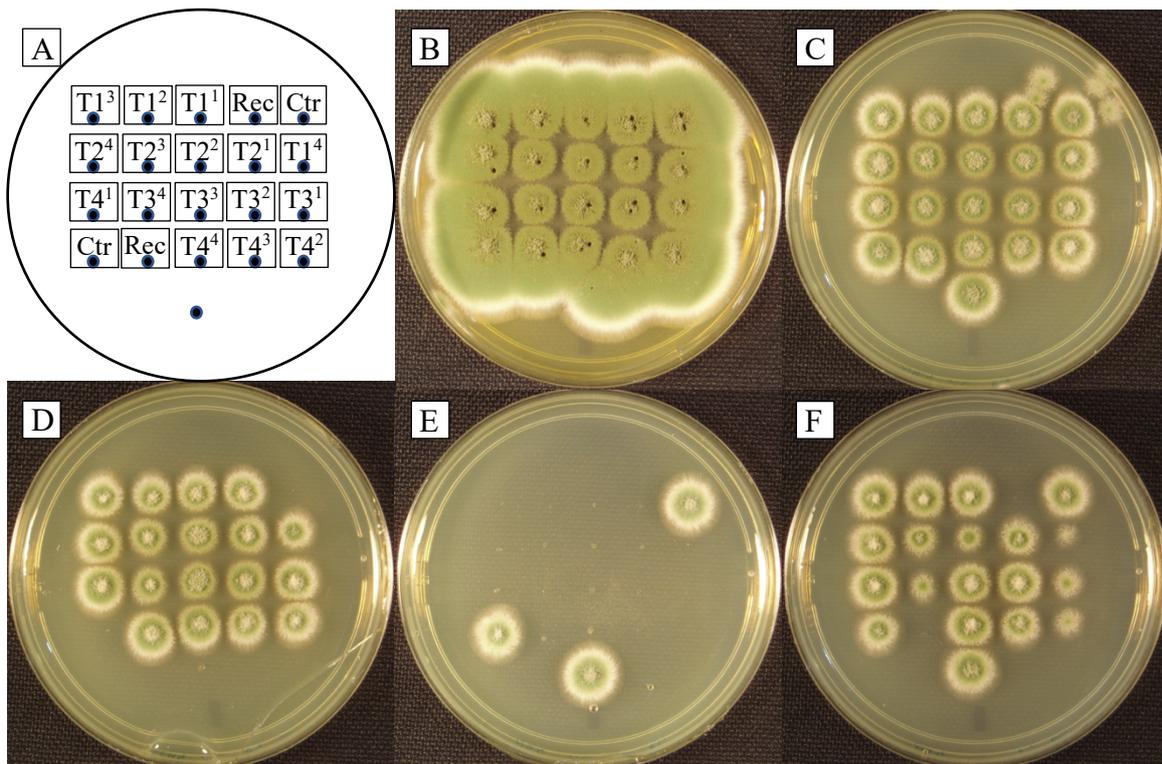


Figura 13. Placas de Fenotipo para analizar los presuntos transformantes 3HA::srpA de la cepa UreA2425. A) Representación del esquema de sembrado. B) Placa madre de MC 1,3% agar + ribo. C) Placa MM 1,3% agar con todos los suplementos necesarios para el crecimiento de todas las cepas. D) Placa MM 1,3% con todos los suplementos, excepto el suplemento paba. E) Placa MM 1,3% con todos los suplementos, excepto el suplemento pyro. F) Placa MM 1,3% con todos los suplementos, excepto el suplemento ribo. Rec = Cepa receptora, Ctr = Cepa control, Tx^z = Replica z del Transformante x.

5.3 Generación de Cepas Transformantes

Del paso anteriormente descrito, se obtuvieron cantidades abundantes de colonias de posibles transformantes (datos no mostrados). De éstas, se procedió a la purificación de un total de 6 colonias transformantes, para cada una de las cepas (*wt* y *ureA₂₄₂₅*). A modo de ejemplo, en el anexo (**Figuras Anexo.1-4**) se muestran imágenes de estas purificaciones sólo para la transformación que se hizo con la cepa *ureA₂₄₂₅*, pero todos los pasos descritos fueron realizados para ambas cepas. Posteriormente, se realizaron las pruebas de fenotipo, a modo de cerciorarse que las cepas cuentan con los marcadores esperados. En las **figuras 13 y 14** se muestran las placas para algunos de los transformantes purificados *ureA₂₄₂₅* y *wt*, respectivamente. En ellas puede verse que, efectivamente, el comportamiento de las cepas es el esperado, de acuerdo a sus genotipos previstos.

En presencia de riboflavina se ve que todas las cepas crecen (**figuras 13.C y 14.B**). Por el contrario, en ausencia de este suplemento, la única cepa que no crece es la receptora, la MVD 2425B (*Rec* en **Figuras 13.F y 13.D**). Estas evidencias nos sugieren que, entonces, la transformación se habría dado de forma exitosa, ya que se logró recuperar el gen *riboB* en los transformantes.

En esta misma placa, en la **figura 13.F**, puede verse que los transformantes T1⁴, T3¹, T4² crecieron más lentamente; esto se estima que no se deba a una dificultad de crecimiento por parte de dichas cepas en ausencia de *ribo*, sino a un error en la manipulación del replicador, habiéndose sembrado menos esporas en ese sector de la placa.

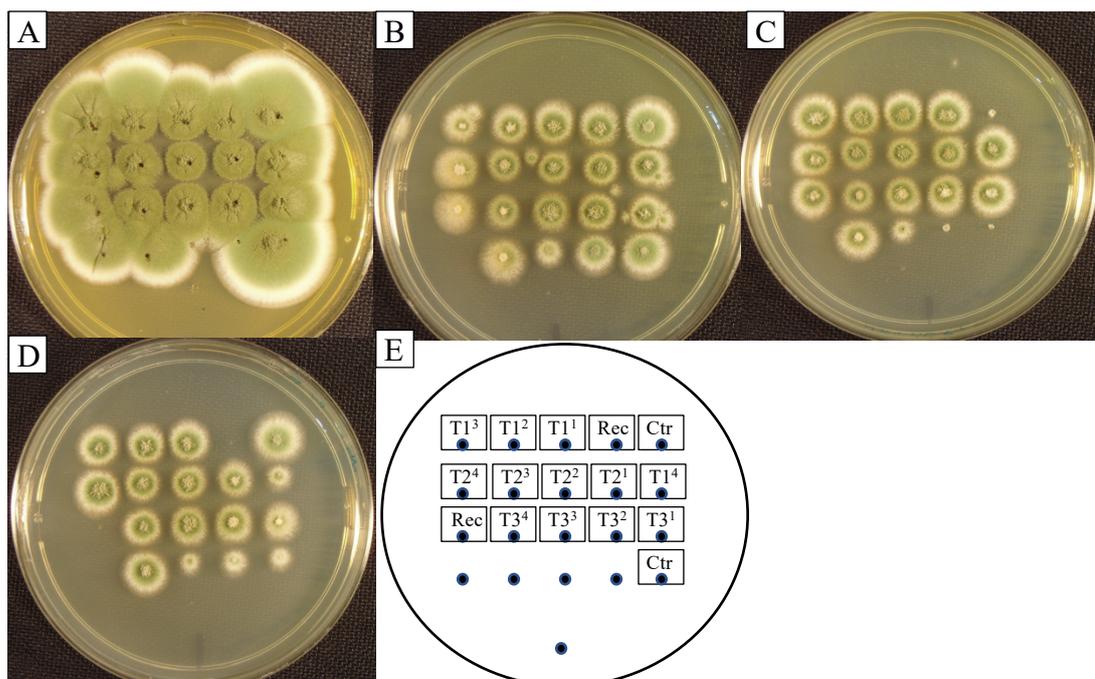


Figura 14. Placas de Fenotipo para los transformantes de la cepa *wt* (MVD 10A). A) Placa madre de MC 1,3% agar + *ribo*. B) Placa MM 1,3% agar con todos los suplementos necesarios para el crecimiento de todas las cepas. C) Placa MM 1,3% con todos los suplementos, excepto el suplemento *paba*. D) Placa MM 1,3% con todos los suplementos, excepto el suplemento *ribo*. E) Representación del esquema de sembrado. *Rec* = Cepa receptora, *Ctr* = Cepa control, Tx^z = Replica *z* del Transformante *x*.

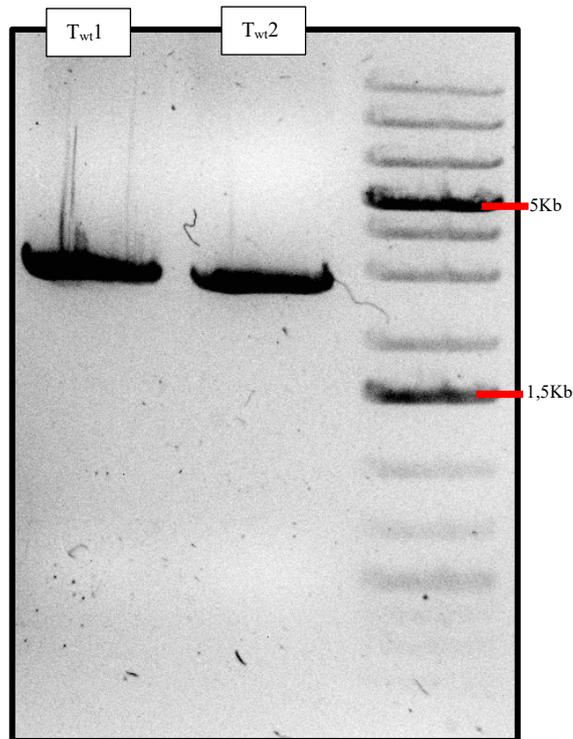


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1%, mostrando el resultado de la purificación de los productos de PCR de la región genómica que presuntamente contendría los 3 tag HA, para los transformantes wt 1 y 2.

5.4 Caracterización Genómica de Transformantes

El siguiente paso para corroborar que la construcción se insertó en el genoma de forma acertada, es el de la secuenciación de la región genómica en donde presuntamente se encontraría dicha construcción. Para esta oportunidad se eligieron dos transformantes al azar de la cepa *wt*, ya que a la altura en la que se estaba preparando el material para enviar a secuenciar, aún no se contaba con transformantes purificados de la cepa *ureA*₂₄₂₅. El primer paso, consistió en realizar una extracción de ADN de estos dos transformantes. En el anexo (**Figura Anexo.5**) figuran las imágenes de los geles de electroforesis de los productos de esta extracción y de los productos de la reacción de PCR, dónde se buscó amplificar la región genómica donde se encontraría el tag 3HA (ver [sección 4.6.3](#), por detalles). En la **figura 15**, se muestra la purificación de los productos de esta reacción de PCR, en donde puede visualizarse una banda única a la altura de las 3kb, el cual es el tamaño esperado (ver secuencias de los cebadores en **sección A1**).

Estos productos purificados fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Corea). Inicialmente, pudimos corroborar que la secuenciación había resultado de buena calidad, ya que los picos mostrados en el cromatograma resultaron bien definidos y con poco solapamiento (ver **Figura Anexo.6**). Además, al alinear con la secuencia genómica (ver **sección 4.12**) de *srpA* en *A. nidulans*, se obtuvo un 100 % de coincidencia. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los resultados mostraron que ninguno de los tag HA había sido incorporado en el genoma en ninguno de los 2 transformantes analizados (**figura 16**, ver secuencias en **sección A6**).

no podemos asegurarlo, ya que el cebador utilizado, hibridaría entre 2 secuencias consecutivas para HA y la diferencia en pares de bases si se incorporasen 2 ó 3 HA, es muy pequeña (27pb) como para distinguirse con la resolución que permite un gel de agarosa 1%. Siendo así, estos resultados sólo nos muestran que las cepas en cuestión contienen al menos 2 tag HA. Para poder asegurarlo con mayor confianza, habría que secuenciar la región. Por otro lado, ninguno de los transformates *wt* parece haber incorporado tags HA (**figura 18**, panel superior).

6. Conclusiones y Perspectivas

Repasando los objetivos planteados al comienzo y teniendo en consideración los resultados obtenidos durante este trabajo y expuestos en la sección anterior, podemos argüir que los mismos fueron cumplidos, al menos parcialmente. Por un lado, se habría logrado generar la construcción génica propuesta conteniendo el tag HA, ya que la visualización por gel de agarosa de los resultados de la PCR fusión, mostró una banda a la altura del peso molecular esperado, según los cálculos realizados. Por lo tanto, el primer objetivo específico de este trabajo, a saber: generación de la construcción *3HA::srpA*, habría sido cumplido de forma exitosa. Sin embargo, dados estos resultados, no nos sería posible aseverar que la construcción contara con uno, dos o tres repetidos del tag. Ya que, teniendo en cuenta que cada HA contiene 27 pares de bases, a la resolución que se realizaron los análisis (agarosa 1%), no nos es posible visualizar diferencias tan sutiles. Por otro lado, el segundo objetivo específico proponía utilizar esta construcción para transformar cepas *wt* y *ureA₂₄₂₅* del hongo *A. nidulans*. En relación a éste, los resultados de los análisis de los fenotipos de los transformantes, mostraron que se obtuvieron colonias que habrían incorporado la construcción, por

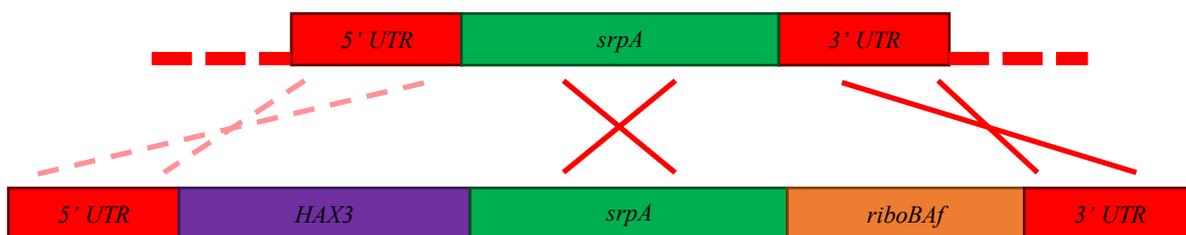


Figura 17. Representación gráfica del presunto evento de recombinación que se habría dado a nivel de la secuencia codificante para *SrpA* (líneas sólidas rojas) en vez de a nivel de la 5'UTR como se pretendía (líneas punteadas rosadas).

su capacidad de crecer en MM sin ribo. Mas los resultados de la secuenciación de dos transformantes *wt* elegidos al azar, develó que los mismos habrían incorporado sólo el gen *riboBAf* y ninguno de los tres tags HA. Presuntamente, la recombinación homóloga entre la construcción y el locus *srpA*, se habría dado a nivel de la secuencia codificante de *srpA* y no a nivel de su 5'UTR, como se esperaba. En la búsqueda de analizar simultáneamente una mayor cantidad de transformantes de lo que sería posible por medio de la secuenciación, se optó por utilizar la técnica PCR colonia. Por medio de la misma, se lograron identificar transformantes que contendrían el tag HA, sólo de la cepa *ureA₂₄₂₅*. En este caso, gracias al diseño de cebadores que hibridarían entre medio de 2 secuencias consecutivas para HA, podemos aducir que estos transformantes habrían incorporado al

menos 2 repetidos del tag. Empero, nuevamente, no nos sería posible asegurar que estas cepas contuvieran 2 ó 3 repetidos, porque la sutil diferencia en tamaño molecular del amplicón en uno u otro caso, sería indetectable al nivel de resolución utilizado para la visualización. Siendo este el caso, los análisis hechos sobre dichos transformantes, no serían suficientes para aseverar que contamos con cepas que hubiesen incorporado la construcción genómica tal y como se planteó en el diseño experimental. Es por esto y por el fallo en obtener transformantes *wt* que hubiesen incorporado al menos 2 tag HA, que se sostiene que los objetivos planteados fueron cumplidos de forma parcial.

El éxito que se habría obtenido en la transformación de la cepa *ureA*₂₄₂₅ (4 de las 6 colonias analizadas dieron resultados positivos en la amplificación por PCR colonia), nos muestra que, a pesar de la cuota de azar que demostró tener la recombinación homóloga entre distintas regiones dentro del mismo locus de *srpA* y la construcción génica, la inserción “correcta” sería posible. En vista de ese resultado, se propone repetir todos los pasos de transformación para la cepa *wt* y realizar análisis por PCR colonia de una mayor cantidad de colonias, en la búsqueda de aquellas que, por azar, hubiesen incorporado la construcción entera.

Puesto lo que se mencionaba más arriba, que los análisis realizados sobre los transformantes *ureA*₂₄₂₅, no serían suficientes para asegurar que la transformación se dio tal como esperado, se

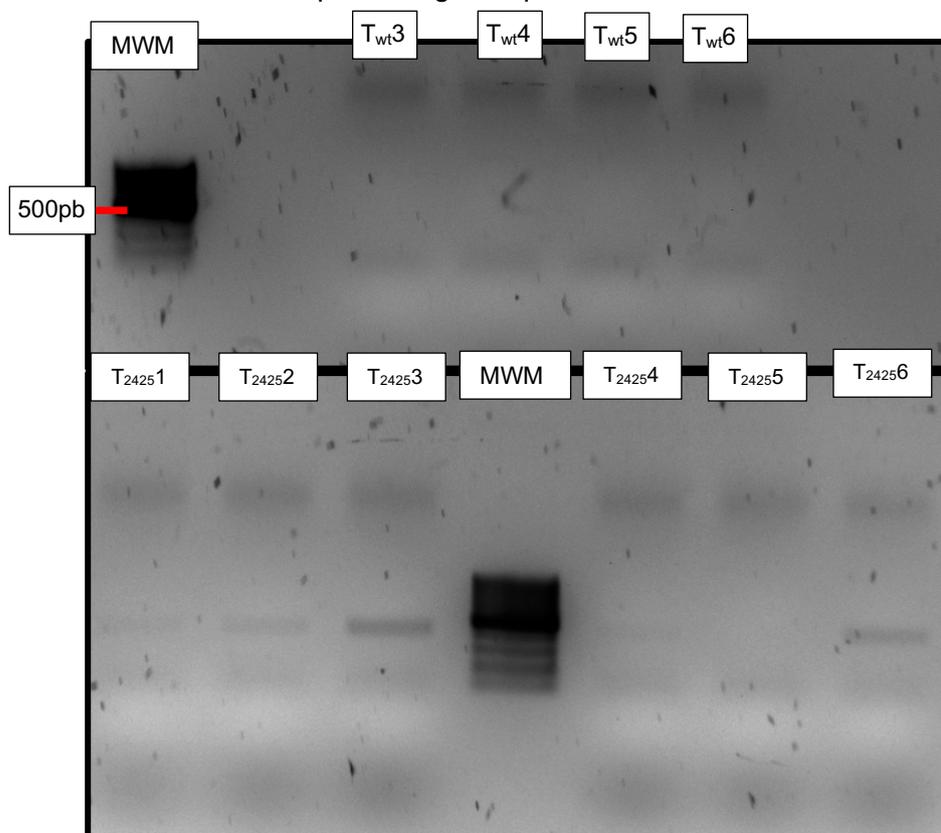


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los resultados de la reacción de PCR colonia. En el panel de arriba se muestra los resultados para las 4 colonias *wt* y en el de abajo para las 6 *UreA*₂₄₂₅.

En este caso se utilizó el marcador de peso molecular (MWM) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™), con el razonamiento de que la banda esperada estaría entre los 400 y los 500 pb. Sin embargo, no resultó ser el indicado para el porcentaje de agarosa utilizado y las bandas quedaron mal resueltas (el fabricante recomienda entre 1,7% y 5% de agarosa). De todas formas, la banda de 500 pb, que es la más intensa, puede visualizarse claramente y, por lo tanto, ser utilizada a forma de referencia.

plantea realizar una serie de ensayos para poder comprobarlo. En primera instancia, la

secuenciación de la región genómica (tal como se realizara para los dos transformantes *wt*), sería necesaria para corroborar la presencia de los 3 repetidos de HA, que su secuencia se encuentre en fase con la secuencia codificante para *SrpA* y que no hubiesen ocurrido mutaciones no deseadas. Otro ensayo propuesto, es un Southern Blot para corroborar que la construcción se haya insertado de forma única y en el sitio esperado. Esto implica que el diseño tendría que ser de forma tal que: por un lado, la sonda hibride con una región de la construcción. Y por otro, que se realice una digestión del ADN genómico de manera que, si la construcción se hubiese insertado en el locus deseado, se genere un fragmento específico de tamaño conocido (esto es posible de calcular, dado que conoceríamos la secuencia que debería tener el transformante). En caso de haberse insertado en otra región del genoma, se observaría una banda de distinto tamaño molecular al esperado y en caso de existir más de una integración, se visualizarían más de una banda. Como último análisis de los transformantes, se propone realizar una prueba que permita ver el resultado de la transformación a nivel de proteína. Un buen candidato para realizar esto, sería un ensayo de western blot, tal como realizado para la cepa de partida MVD 425.

Las herramientas aquí desarrolladas, muestran un gran potencial para el futuro estudio de la interacción entre SRP y, ya no sólo con los ARNm de *UreA* siendo traducidos, sino con todos aquellos que codifiquen para otras proteínas que pudieran ser de relevancia. Además, implica un gran instrumento para realizar aportes sobre el peso que tiene la cinética de la traducción, en la regulación de la expresión.

7. Referencias

- Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S. and Ramon, A. (2010). UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12), pp.1023–1033.
- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. and Shan, S. (2013). Signal Recognition Particle: An Essential Protein-Targeting Machine. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp.693–721.
- Alamo, M. del, Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O. and Frydman, J. (2011). Defining the Specificity of Cotranslationally Acting Chaperones by Systematic Analysis of mRNAs Associated with Ribosome-Nascent Chain Complexes. *PLoS Biology*, 9(7), p.e1001100.
- André, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(16), pp.1575–1611.
- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A.E. and Rospert, S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), pp.1398–1403.
- Chartron, J.W., Hunt, K.C.L. and Frydman, J. (2016). Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature*, 536(7615), pp.224–228.
- Collart, M.A. and Weiss, B. (2019). *Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events*. *Nucleic Acids Research*, 48(3), pp.1043–1055.
- Costa, E.A., Subramanian, K., Nunnari, J. and Weissman, J.S. (2018). Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science*, 359(6376), pp.689–692.
- Darlington, A.J. and Scazzocchio, C. (1967). Use of Analogues and the Substrate-Sensitivity of Mutants in Analysis of Purine Uptake and Breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 93(3), pp.937–940.
- Diallinas, G. and Martzoukou, O. (2019). Transporter membrane traffic and function: lessons from a mould. *The FEBS Journal*, 286(24), pp.4861–4875.
- Egea, P.F., Stroud, R.M. and Walter, P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(2), pp.213–220. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15837181/>.
- Etxebeste, O. and Espeso, E.A. (2019). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), pp.5–22.

- Gournas, C., Evangelidis, T., Athanasopoulos, A., Mikros, E. and Sophianopoulou, V. (2015). The *Aspergillus nidulans* Proline Permease as a Model for Understanding the Factors Determining Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), pp.6141–6155.
- Guidotti, G. (1972). Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 41(1), pp.731–752.
- Halic, M. and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1), pp.116–125.
- Hegde, R.S. and Bernstein, H.D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(10), pp.563–571.
- Iriarte, A., Sanguinetti, M., Fernández-Calero, T., Naya, H., Ramón, A. and Musto, H. (2012). Translational selection on codon usage in the genus *Aspergillus*. *Gene*, 506(1), pp.98–105.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M. and Walter, P. (2001). The Signal Recognition Particle. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp.755–775.
- Kennedy, S.J. (1978). Structures of membrane proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 42(3), 265–279. Doi:10.1007/bf01870362
- Képès, F. (1996). The “+70 Pause”: Hypothesis of a Translational Control of Membrane Protein Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 262(2), pp.77–86.
- Kryptou, E. and Diallinas, G. (2014). Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 63(2014), pp.1–8.
- Lakkaraju, A.K.K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A.E. and Strub, K. (2008). SRP Keeps Polypeptides Translocation-Competent by Slowing Translation to Match Limiting ER-Targeting Sites. *Cell*, 133(3), pp.440–451.
- Mason, N., Ciuffo, L.F. and Brown, J.D. (2000). Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *The EMBO Journal*, 19(15), pp.4164–4174.
- Mercier, E., Holtkamp, W., Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2017). Signal recognition particle binds to translating ribosomes before emergence of a signal anchor sequence. *Nucleic Acids Research*, 45(20), pp.11858–11866.
- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C. and Jovine, L. (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *The EMBO Journal*, 22(14), pp.3479–3485.

- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A. and Oakley, B.R. (2005). A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), pp.1557–1566.
- Ogg, S.C. and Walter, P. (1995). SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell*, 81(7), pp.1075–1084.
- Pateman, J.A., Dunn, E. and Mackay, E.M. (1982). Urea and thiourea transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Genetics*, 20(7-8), pp.777–790.
- Pechmann, S., Chartron, J.W. and Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), pp.1100–1105.
- Samatova, E., Daberger, J., Liutkute, M. and Rodnina, M.V. (2021). Translational Control by Ribosome Pausing in Bacteria: How a Non-uniform Pace of Translation Affects Protein Production and Folding. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Sanguinetti, M., Amillis, S., Pantano, S., Scazzocchio, C. and Ramón, A. (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(6), p.140070.
- Sanguinetti, M., Iriarte, A., Amillis, S., Marín, M., Musto, H. and Ramón, A. (2019). A pair of non-optimal codons are necessary for the correct biosynthesis of the *Aspergillus nidulans* urea transporter, UreA. *Royal Society Open Science*, 6(11), p.190773.
- Sharp, P.M. and Matassi, G. (1994). Codon usage and genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(6), pp.851–860.
- Shen, K., Zhang, X. and Shan, S. . (2011). Synergistic actions between the SRP RNA and translating ribosome allow efficient delivery of the correct cargos during cotranslational protein targeting. *RNA*, 17(5), pp.892–902.
- Stroud, R.M. and Walter, P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), pp.754–759.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A. and Oakley, B.R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, [online] 1(6), pp.3111–3120. Available at: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.405>

- Tavoularis, S.N., Tazebay, U.H., Diallinas, G., Sideridou, M., Rosa, A., Scazzocchio, C. and Sophianopoulou, V. (2003). Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology*, 20(4), pp.285–297.
- Todd, R.B., Davis, M.A., Hynes, M.J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2:811–821.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
- von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), pp.909–918.
- Wallin, E. and von Heijne, G. (2008). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*, 7(4), pp.1029–1038.
- Wild, K., Juare, K.D., Soni, K., Shanmuganathan, V., Hendricks, A., Segnitz, B., Beckmann, R. and Sinning, I. (2019). Reconstitution of the human SRP system and quantitative and systematic analysis of its ribosome interactions. *Nucleic Acids Research*, 47(6), pp.3184–3196.
- Yeagle, P.L. (2016). *The Membranes of Cells*. 3rd ed. The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK: © Academic Press 2016. Available at: <https://www.elsevier.com/books/the-membranes-of-cells/yeagle/978-0-12-800047-2>.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y. and Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), pp.973–981.
- Zhao, L., Cui, Y., Fu, G., Xu, Z., Liao, X. and Zhang, D. (2021). Signal Recognition Particle Suppressor Screening Reveals the Regulation of Membrane Protein Targeting by the Translation Rate. *mBio*, 12(1).

8. Anexo

A1. Secuencias cebadores

El código de color en qué aparece el nombre de cada cebador, se utiliza para marcarlo en la secuencia de la construcción entera que aparece más abajo.

A1.1 Fusión-PCR

- Generación del primer fragmento (K -1403 pb)

Srp54-5Fw - 5' GGA~~ACTGGACGGATTGGTGGT~~GCGA 3'

HA~~srp-Rv~~ - 5' AGCGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTACATTGTGACGGTCCCTGGTAG 3'

- Generación segundo fragmento (G - 4933 pb)

HAX3-srpA-Fw –

5'TACCCTTACGACGTTCTGACTACGCTTACCCTTACGACGTTCTGACTACGCTTACCCT-
TACGACGTTCTGACTACGCTGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGCGAA 3'

Srp54-3Rv - 5'CCGTCGAGTTTACTCATCCCCCTCC 3'

- Generación la construcción entera (5760 pb):

Srp54-5N-Fw - 5' GGCTTCCCCTTCTTGCCGTTGATCA 3'

Srp54-3N-Rv - 5'TCTGGATACCCGTTCTACCGCTCC 3'

A1.2 PCR-Colonia

HA3T-Fw 5' CCTGACTACGCTTACCCTTACGA 3'

SrpA1-Rv 5' GACCGACGAACATGATGACA 3'

A1.3 Secuenciación

Srp54-5N-Fw - 5' GGCTTCCCCTTCTTGCCGTTGATCA 3'

SrpA-RiboAf-Rv - 5' AGACTCCTGAACGGCCTCTTCTACCGTCCCCGTCCCCTTC 3'

SeqSRP2-Fw - 5' CCTGTACCAAGCTTGCCCGACACTA 3'

A2. Secuencia de la fusión entera:

En rojo: secuencia 5' UTR y 3' UTR de *srpA*

En violeta: secuencia de HA

En negro: secuencia codificante de *srpA*

En negro subrayado: secuencia codificante se *riboB A. fumigatus*

CGAACTG**CGAC**CGEAT**TG**GT**GTG**CG**CGA**CTGCCTTCAATGACCCGGAATCTGCAGGCGAGCGACTTCCAAACGAAGAAATAAA
 TTAGGGCTTCTTGGCAGACATGTATTATTATAATCAAATATACAGCGGACGTAAGTTGAGTAGATGTAATATAATAGGGT
 ATTCCAATCTCCATATCAGCCATTTTAACGGGACGAGAAGTCGGTCTAATAAACTGTACATAACTTTTGACCCATGATAC
 CATTAACGCCGTGAATATAACCAATGCCACTTCAACGACTGTCAAGCTTCTCGATGTTGAGAG**GGCTTCCCCTTCTTGCC**
GTTGATCAATTCCAAAAACCCCTGCTTGCTGACCTGGTTAACTGCCTTCTCCCGCTCGCCAATTCGGACTGTGCCCTTCT
 TCCTCTCTTCCTTGGCAGCCTCTTACCACGTACCTGCGCGGCACGAACGGCATTGAACAGTTTACCACACCCGCGCTGT
 GCGATTTTGGCAACCGCTTCTCCTCCTCTGCCACAGCACCGGCCTGGCCTGTGAAATACCCCGTACATCACGAACGCG
 ACCCTGTCCAACCTCTCCTTCTTTTCTGCACGTAGCTTGCCCGTGGCCGATTGTCCAGCTTCTCTTCCGCAATTTGAG
 AGGTGATTTGTGTCACGGTTTTGCTGCGCGATAGGACAGGATCTGCACGGGCAGACGTTGGTAATTTGTCGCAAGGATC
 TTCGAGATGGAAGTAGAGAATGCCGTAGGGTCATTCCGTTTAGGAACTGTCTCTTTTCTATAGCACCGGTTGGTGTAGA
 GCCATCGGAATGAGCATCATCGTCTGTATCGTCCACATCGGAGTCGTCTGGACGCGGACTCATCGTCTCGCTTG
 AAGAATCTTCTTGAGGTTCTGGTTTTCTTTGCTTCCTTGCTTTTCTGTTTGTGTTTGTGCTTGGCAGCTGGCTCCTCTGTT
 TCCTCGTCGGAATCCGCAAGATCAACTGCTTTGAAGTCGGCGGTTCTGTCGTGGCCTCGTCGGAGCTGCTATGGTATTC
 GCGCTGCTTCCTGAATTTCTTGTTCGGGCGGCCGTTTTGCCCTGAAAGCCCTCAAGAACCTTCCGCTTCTTCTGGCTTG
 TCGTAAGCGGCATCTTGAACCTCAGCAATATCGAATTTGTGAGGTGCCCTGTGAATTGCAAAGATGGTGCAGCCTTGAA
 CTTTTTCTGTTGCGGGCGAAAACGGCCGCGGCCCTGATTGGTTGTGGGGTCAACGTTGGCCTCTTCGGGCTCTCCTTC
 GCCTCTCCCTCTTCAACTACTCTGCTTTCGCGGGATATTGTGCTGTGAATCCATTTTGTCCAATAAGACTTGCA**CTACC**
AGGGACCGTCACAATG**TACCCTTACGACGTT****CTGACTACGCTTACCCTTACGACGTT****CTGACTACGCTTACCCTTACG**
CGTTCCTGACTACGCTGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGGCAA**TCAACGCCCGCTCAATGAC-**
 TTGACTCGGTACCTAATCTGGACGAAAAGGTACGCCCCGCTACGTATACGACAACCTGAAAGATGCTGATTTTAGGAGT
 AAAGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGGAGATCTGCGCCGCCCTTCTCTCTGCCGACGTCAACGTTTCGTCTTGTTCAGTCAC
 TCCGCAAGTCTATTAAAGCCAGCGTCAACTTCGCCTCCCTCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTCAAAGGCC
 GTCTTCGATGAGCTCGTAGCCTTGGTCAACCCACATGCAGAGCCATTTCCGCCCTAAGAAAGGCCGATCAAA**TGTCATCAT**
GTGTCGGTCTGCAGGTGCAGGTAAAACGACAA**CTGTACCAAGCTTGCCCGACACTA**TCAAATGCGCGGGTTCAAGA
 CGGCCCTCGTTTTGTGCAGACACTTTTCGAGCTGGTGTCTTCGATCAACTGAAGCAGAACGCGACAAAAGCTAAGATTCCG
 TACTACGGTAGCTTAACACAAACCGACCCGGCTGTGCTAGCAGCAGAGGGTGTAGCCAAATTCAGAAGGAGCGATTTGA
 GATTATTATTGTTGATACTAGTGGTTCGTACAAGCAGGAAGAACAGCTGTTTACGGAAATGACCCAAATCCAGACGGCGG
 TGACGCCGTGACCAGACTATCTTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGGAGGTGCAATCCTCGGCCTTTAAAGCC
 ACTGCAGATTTTGGAGCTATCATAATCACAAGACCGATGGTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAGTCGCAGC
 CACTCATAACCCCTATTATCTTTCTTGGAACTGGTGGCATATGATGGATTTGGAGCGTTTCGAACCCAAAGCATTATCC
 AGAAGCTTCTTGGTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCACGTTTACGGCCGTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCAAG
 GAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGGTATTTATACCCTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACATCAATCATGAAGATGGG
 CCCGCTGTCAAAGCTTCCGGTATGATCCCTGGCTTGTCAAATCTTACCGCCGGCCTTGACGATGAGGACGGCTCCATGA
 AACTGCGCCGCATGATCTATATATTTGACAGCATGTGAGCCGTCGAATTGGACAGCGACGGCAAGATCTTTGACACACAG
 CCGAGCCGAATGGTTTCGTATTGCCATGGTAGCGGCACTTTCAGTGCAGCAAGTTGAGGATCTCCTGTACACAACCCGCAT
 GATGGCCGGGATGGCGAAGCGTGTGCGTGGCCAGAAGAAGCAAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTGGCAACA
 AGGATCAACAGCTTGTGCTATGCAGAAGCGGATGGCCTCGATGGGTGGAGCTGGTGGCATGGGCGGCATGCCCGGAATG
 GCGGATATGGCGAAGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGTGGTGGTGGGCTGCC
 AGGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAGTCGATGATGAGCCAGATGAGCGGGTTGATGGGCGGTATGGGAGGTGGTGG**GAAGGG**
GACGGGGACGGTAGAAGAGGCCGTTCAGGAGTCTGGCTCGTTTGTATCACATGGGATTTAAATATGGTGTGAGGCTGGGA
 TATTTTATGTTTTGTCTCTTGCCTTCGATATCAACAGATTGACAATAATGAATAACTATCTACGGACTATGAATGCAGC

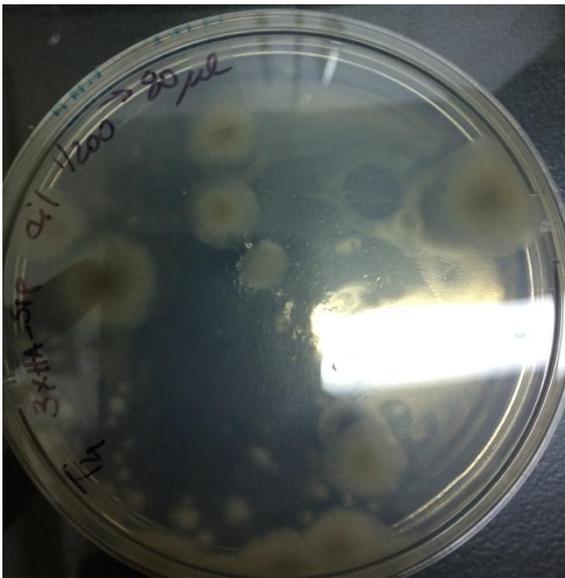
TCGATCTACTCCGTATTTAGTCGGGCAATCTCCCGTAGAAGATGCTAGACTGCGCTGAAAGACTAGGCACAGTTAATTGC
CGCGGATCACGTCAGGCCTGACAAATGACAGGTGGACCTTCATGTAATCGCACGATGAGTCAGCGCCTCTTCTCCCCCGC
CGACTTGCAGCTGCGGATGTCCCGAGGAGCCGAACATTGAATCTATCCCAAGAGTGACTGAAATATGATTGCAATCGTCG
TCTTTTTCTTGCAGAGAATGTGGTGGAGTGATCAATCGTGTTTTTCTTTCATATATTATATTCTGTAATGATCATACTTTG
TTGAGATACCCGTCTCTAAAATTGTACTTTTCGCTCCCTCCTCCCTCTCAAGTCCGTCATCGCAATGTGCAATTTACCGT
CCCATGCTTCTCCGTCTTTTGGGGCGCAAACGCCTACCACGCCGAGCCCGTCGACGAGCTTTCTCTCAAGTCTGAACATC
ACATCAGCCCCCTGCGTTACACTCCAGATTAGACGAACTCCGAGATGAGACTTCCAGCCAGATCAGCAGCATAGACACTGA
CCGCGGGGACATGACCCCTGCGGTTCCCGCATCATTACTCTCCCCATCCTTCACTCCTCCAGCAACCCCCGGGGGCTCGA
TCAATACCGCGGAGCTGCTTCAACAGACCCAATTAGCTGGCGCACGGCAAGGGTCAACACATACTAAGCCCCGAGGTTG
CTTTCTCGTCTTCCAATGTGCAATGTATCGTCCGCGCTCGGATACCCACGACAACCTGGCGCGGAGATGTTTCTTACCT
GTACCACAATGACTTAGACAACAAAGAGCATTGGCGATTGTGTTTGGAAATACAATTCGAAGCAGAAGCTTGGACAAGA
TCCGGCCTGGAGAGACGGAGATGGATCGCATGATCCGTGGCGCGTATGTGCGGAAACTCCGACCGGGCCGTGTGAGCAGC
TGGTATGACGAGGAGAAAGCTGAAGAGGCCGCCAGTCCGGAAGCTGGCGGCGCTGTATCCAGTCCGCACACACTGCCGCG
AAGTAGCCTCAAGGAGGCACCTCTTGTGAGAATCCATTCGGAGTGCTACACTGGTGAGACGGCTTGGTCTGCACGCTGCG
ACTGCCGCGAGCAGCTCGATGAAGCAGCTCGCCTCATGTGCTGCCTATGGAAACGTTGGCAGAGGCTGCGTCACCGCCG
GATGGGGCGGTACCGTCAAATGCTGCTGGAGGTGTAATTGTGTACCTGCGCCAAGAAGGACGAGGCATTGGGCTGGGGCA
GAACTGAAAGCGTACAATCTTCAGGATCTGGGATCAGACACGGTGAAGCCAATCTCCTGCTTCGCCACCCTGCGGATG
CAAGAAGTTATGGATTAGCTACGGCGATCCTGGTGGATCTTGGTCTAGGGATTGACTCGAATCCGCACGGCATCCGACTA
CTCACGAATAACCCGGACAAGATTCGAGCGGTTGAGGGACCAACCGAGAAGTGGTGGTGAAGAGCGGGTGCCGATGGT
GCCATTGGCATGGAGATCGGGTGGAAAGATGGGAATCAAGAGTTCGGAGGTCGAAGGGTATCTGAGAACGAAGGTATGTC
GACAATCTATCTCTTGCAAGCTAGCTTATTTTCTCATATTCTTAAACAATGTCTCACTCTCTCCTCGCAGATATCGAAA
ATGGGCCATTTGCTCCAATGAACCTATCCCCTTTCGGTTAGTAACCTTGTGCTGGAAGTACGCCTTCTGCTTTTGGACT
TAGCCAAGTCGACACGGTGTATGCTCGTCACACTCATGTAACGGTTCTGCAGCGGCTGTTTATCTTCGCATGGGAGGCGT
CCGGCGCATATCTAATCTCTCTTTTTTGTGTATCCCAGAAACATCCTCACGCCATCGCATTCTTGTATATCTATTTTTCC
AAATCGAACCAACAAAACACTACTTTTATACGTACTTATATTCGCGTTTGTCACTATATTTTTCCCAAATTCAAACGACCCAA
TCCTTACTGGCATGCTCAACTCTCATCACATCCCACCAAAACACTCTCTTAGCAATGACATCCACCCACCCATCGACCGT
CTTGTCAACCAAAACTTCCCCAGGGGGAAGCAATGCACCCGAGCTGAAGTTCCCGCTGCCGCATCTGCCGACGCAGCAG
GCTCTTCAGCTTCCGAAGTCAGAGCCAATGGCACACTTAGCCTGTACTTCAAACCATGTTCTCATCGATATAGAGTGAA
TATGTAAGGACAGAGCTTGGCACACCATCCACAACACCATCTTCTATCTCCACGAGGCCAAACTTCGTGTTCCCATCGGG
AAGGTACTTAATGGGAACGTCGTCCGGGCCAGACTGGTAGTATGTGCGTACGGGAACGTAAAACATGCTCAATGGGCCGG
TGCAGAATTCAACAAGATCCTCGCCGATTGAGGACTTCTTGGTTCTGGATACGGGGCGATTGAGATTGCGAGTCGACG
AGTGGGTCATATTCAGGAACGTAGGGAATCGCGTAGCGGCAAACCTCGTGTCTGTGCGCGGAGAGAAGAACGACTCGAAT
ATCCAGGGCCCGTTGAGCGGCGCGCATGGCGTCAAGACAACGCGACGCTCGGAGAGGAAGCCGCCCCATGTGTCTGCCG
TGCCGGCGTGCCAATTCAGAGTGAAGGAACGCTGGAGGAGACGATCTTCCAGCGGACATGTGGAGGTTCCGGGCGGGCG
AGGAAGGATAGTAGGGCATTAAAGCTGGGCTTTGCCGAGGATTGTCTCGTCTGCGGACCTTACCAACCGCTATCCAC
AGGAAGAAGGCAGCAGGGCCGTTGGTGAACATCGTATACGAGTGCTTTGTGTTCTCCGTTGTGACGTCTGGAGCAGGGG
GGTTCACAGAGGCGTGGTAATGCACGTAGGGTCAATAGCAGCTGGGTAGGGGGTGTACTATTGCCGTGTTTCCAGTCA
TTTGGCATCTCATGGTCTCAAGAGTGTGAATCCATGGGAGGTTGGCCGCTGACCAGGTCCA

A3. Genotipos Cepas

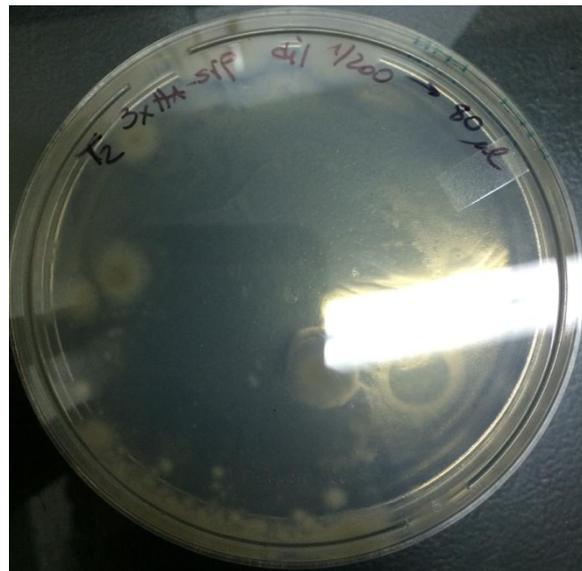
TablaAnexo. 1

| Nombre | Genotipo |
|----------|---|
| MVD 001 | wt pabaA1 |
| MVD 425 | yA2 ureA::gfp::pyrGAf ha::srpA::riboBAf riboB2 pyrG89 pyroA4 pabaA1 Δ nkuA::argB |
| MVD 10A | ureA::gfp::pyrGAf riboB2 pyrG89 pyroA4 Δ nkuA::argB |
| MVD2425B | ureA2425::gfp::pyrGAf pyrG89 pyroA4 riboB2 Δ nkuA::argB |

A4. Placas Transformantes purificados MVD 2525B



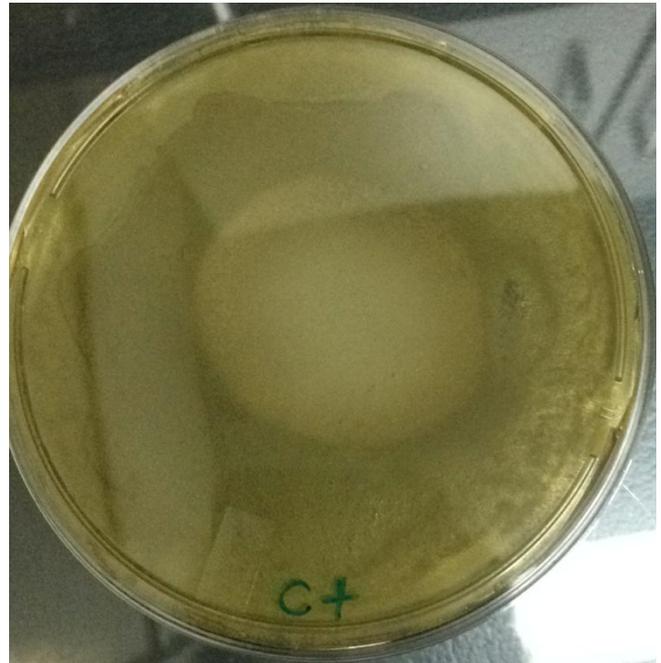
FiguraAnexo.1.



FiguraAnexo.2

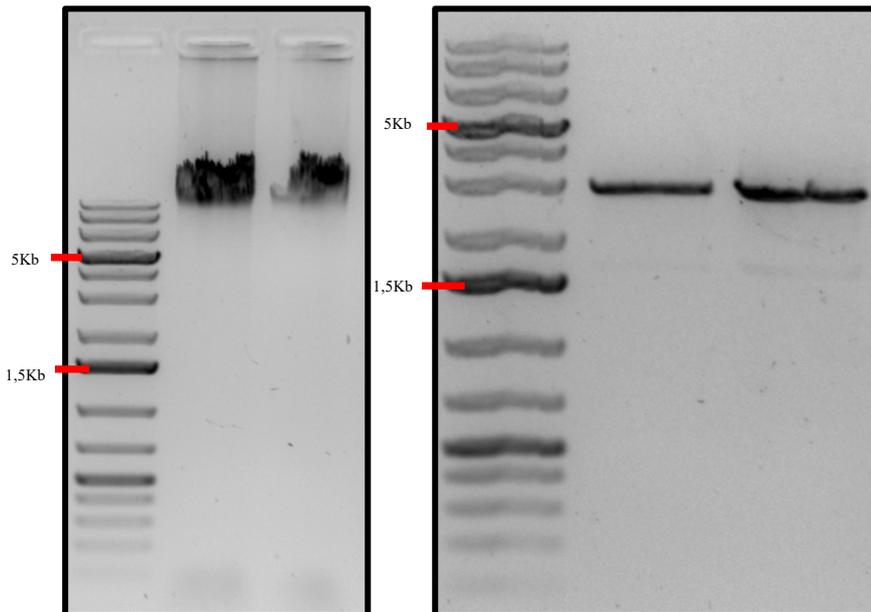


FiguraAnexo.3



FiguraAnexo.4

A5. Resultados de Extracción de ADN y PCR para secuenciación.



FiguraAnexo.5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. A) Resultado de la extracción de ADN de los transformantes wt 1 y 2. B) Resultado de las reacciones de PCR, para los mismos transformantes.

A6. Resultados de la Secuenciación por Macrogen (corea)

>H201210-047_N24_3HA-T3_Sec5UTRSrpA.ab1 1233pb

CCCCTTACAACCTCTGCTTTTCGCGGGATATTGTCGTGTGAATCCCATTTTGTCCAATAAGACTTG
CACTACCAGGGACCGTCACAATGGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGCGAATCAACGCCGCCGTC
AATGACTTGACTCGGTCACCTAATCTGGACGAAAAGGTACGCCCCGCCTACGTATACGACAA
CTGAAAGATGCTGATTTTAGGAGTAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGGAGATCTGCGCCG
CCCTTCTCTCTGCCGACGTCAACGTTTCGTCTTGTTTCAGTCACTCCGCAAGTCTATTAAGCCA
GCGTCAACTTCGCCTCCCTCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTCAAAGGCCGTC
TTCGATGAGCTCGTAGCCTTGGTCAACCCACATGCAGAGCCATTTTCGCCCTAAGAAAGGCCG
ATCAAATGTCATCATGTTTCGTTCGGTCTGCAGGGTGCAGGTAAAACGACAACCTGTACCAAGCT
TGCCCGACACTATCAAATGCGCGGGTTCAGACGGCCCTCGTTTGTGCAGACACTTTTCGAG
CTGGTGCTTTTCGATCAACTGAAGCAGAACGCGACAAAAGCTAAGATTCCGTACTACGGTAGCT
TAACACAAACCGACCCGGCTGTCGTAACAGCAGAAGGTGTAGCCCAATTCAAGAAGGAGCGA
TTTGAGATTATTATTGTTGATACTAGTGGTTCGTCACAAGCAGGAAGAACAGCTGTTTACGGAAA
TGACCCAAATCCAGACGGCGGTGACGCCTGACCAGACTATTCTTGTGCTTGATGGAACAATT
GGACAAGCCGCGGAGGTGCAATCCTCGGCCTTTAAAGCCACTGCAGATTTTGGAGCTATCAT
AATCACAAAGACCGATGGTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAGTCGCAGCCACTC
ATACCCCTATTATCTTTCTTGGAACTGGTGAGCATATGATGGATTTGGAGCGTTTTCGAACCCAA
GCATTTATCCGAAGCTTCTTGGTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCACGTTTCAGGCC
GTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCAAGGAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGGTATTATACC
CTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACATCAATCATGAAGATGGGCCCGCTGTCAAAGCTTTCC
GGATGATCCCGGGCTGGTCAAATCTTACTCGCCGGCCTTGCCCAT

>H201210-047_L24_3HA-T3_SeqSRP2.ab1 1236pb

AAAGCGCGGGTTCAGACGGCCCTCGTTTGTGCAGACACTTTTCGAGCTGGTGCTTTTCGATCA
ACTGAAGCAGAACGCGACAAAAGCTAAGATTCCGTACTACGGTAGCTTAACACAAACCGACC
CGGCTGTTCGTAGCAGCAGAGGGTGTAGCCAAATTCAAGAAGGAGCGATTTGAGATTATTATT
GTTGATACTAGTGGTTCGTCACAAGCAGGAAGAACAGCTGTTTACGGAAATGACCCAAATCCAG
ACGGCGGTGACGCCTGACCAGACTATTCTTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGGA
GGTGCAATCCTCGGCCTTTAAAGCCACTGCAGATTTTGGAGCTATCATAATCACAAAGACCGA
TGGTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAGTCGCAGCCACTCATACCCCTATTATCTT
TCTTGGAACTGGTGAGCATATGATGGATTTGGAGCGTTTTCGAACCCAAAGCATTTATCCAGAA
GCTTCTTGGTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCACGTTTCAGGCCGTAACGAAGGACT
CAGCCGCTGCCAAGGAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGGTATTTATACCCTCCGCGACTTCC
GCGAAAACATTACATCAATCATGAAGATGGGCCCGCTGTCAAAGCTTTCCGGTATGATCCCTG
GCTTGTCAAATCTTACCGCCGGCCTTGACGATGAAGACGGCTCCATGAAACTGCGCCGCATG
ATCTATATATTTGACAGCATGTCAGCCGTCGAATTGGACAGCGACGGCAAGATCTTTGACACA
CAGCCGAGCCGAATGGTTCGTATTGCCCATGGTAGCGGCACTTCAGTGCGCGAAGTTGAAGA

TCTCCTGTCACAACACCGCATGATGGCCGGGATGGCGAAACGTGTCGGTGGCCAGAAGAAG
CAAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTGGCAACAAGGATCAACAGCTTGCTGCTAT
GCAGAAGCGGATGGCCTCGATGGGTGGAAGTGGTGGCATGGGCGGCATGCCCGGAATGGG
CGATATGGCGAAGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGCCGCGCCGCCGCCGCGTGGTG
GTGGTGGTGGGCTGCCAGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAATCCATGATGAACCAAATGAACG
GTTGATGGCGTATGAAAGGTGGTGGAGAGGGGGCGGGGGGGGCTAAAAGGGCTTTT

File: 3HA-73_Sec5UTRStrpA.ab1 Run Ended: 2020/12/12 1:15:11 Signal G:689 A:676 C:962 T:652
 Sample: 3HA-73_Sec5UTRStrpA Lane: 84 Base spacing: 15.85004 1233 bases in 14803 scans Page 2 of 2

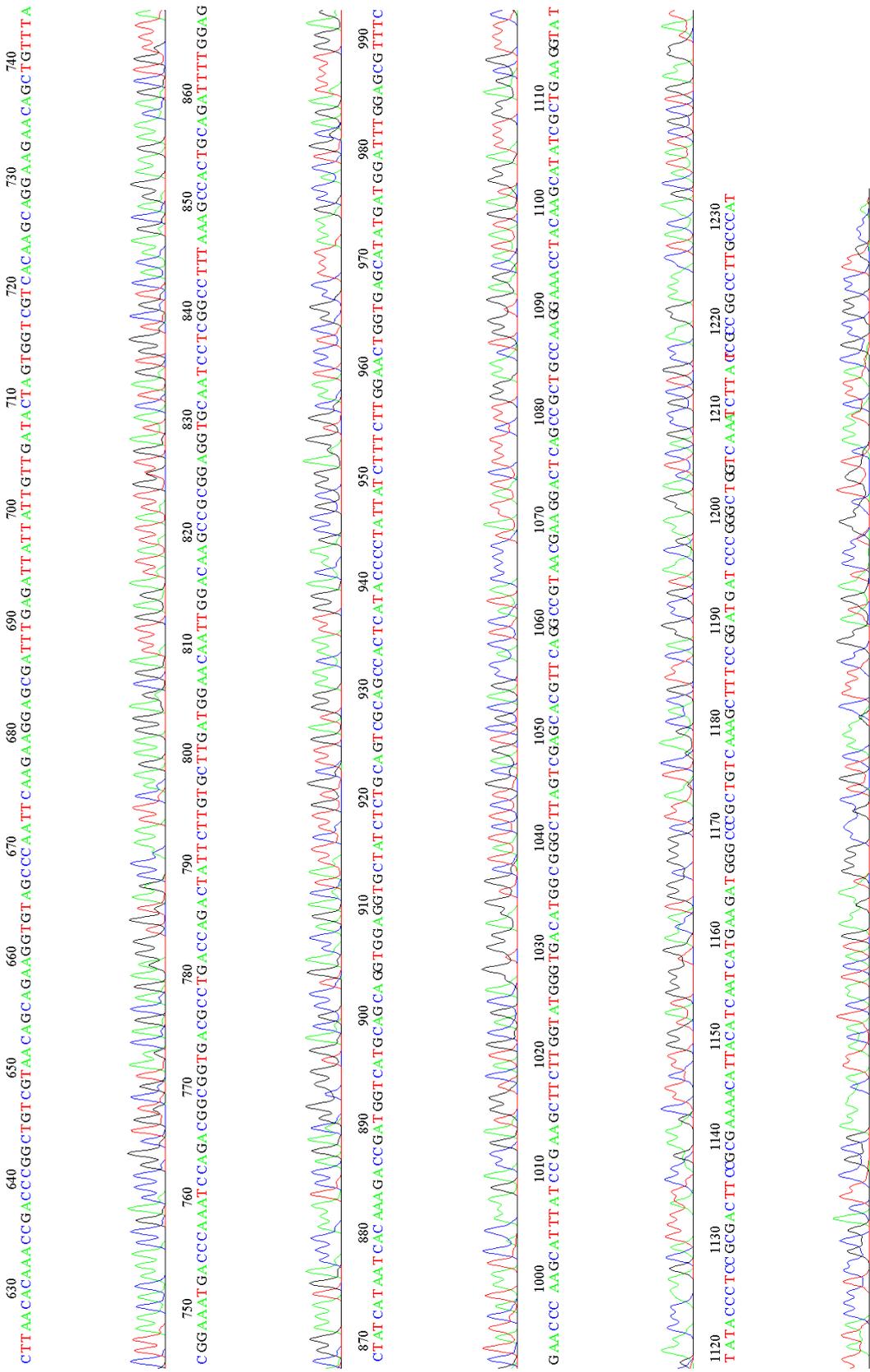
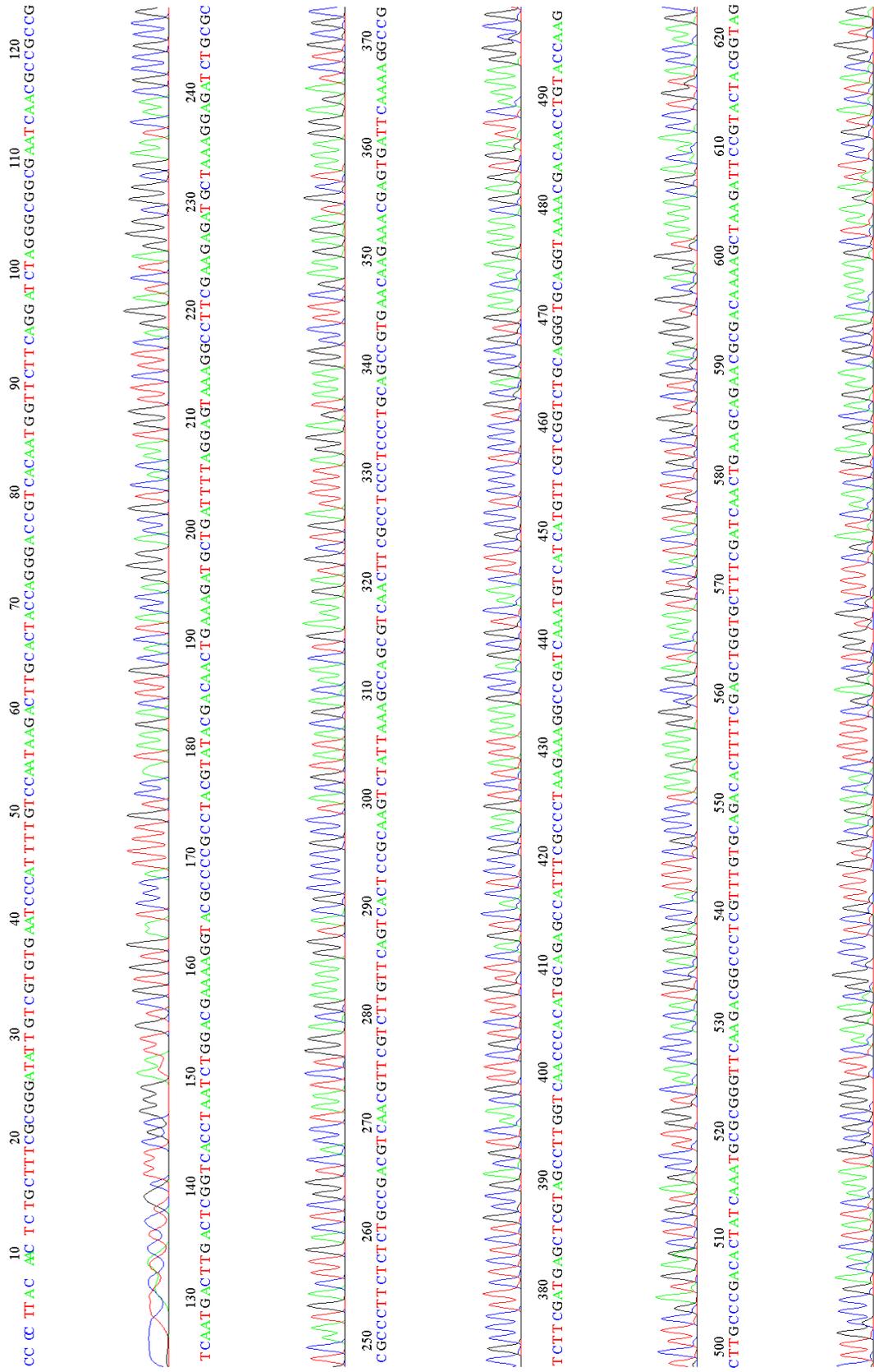


Figura Anexo.6 Cromatograma del resultado de la secuenciación para el transformante T2 de la cepa wt.



FiguraAnexo.7. Cromatograma del resultado de la secuenciación para el transformante T2 de la cepa wt.