



Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica.  
Facultad de Ciencias, UdelaR, 2021.

# Generación de plásmidos para la determinación de la interacción *in vivo* entre UreA y ArtA en *Aspergillus nidulans*

*Bachiller Irene Larghero Valdivia*

Tutor: Manuel Sanguinetti  
Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR  
Octubre 2021

# Agradecimientos

A mi familia, por incentivar mi curiosidad y por el apoyo constante.

A Manuel Sanguinetti, por tomarse el tiempo y tener la paciencia para enseñar. También por el apoyo ininterrumpido y la dedicación continua.

A la Sección de Bioquímica, especialmente al laboratorio 313, por aceptarme como parte del equipo y siempre estar dispuestos a darme una mano.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado durante este trayecto.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>7</b>
1.1 Transportadores de membrana	7
1.2 Tráfico intracelular de transportadores de membrana	8
1.2.1 Ubiquitinación	10
1.2.3 Adaptadores	11
1.3 Aspergillus nidulans como modelo para el estudio del tráfico intracelular de transportadores	13
1.3.1 Presentación del organismo	13
1.3.2 Ciclo de vida de Aspergillus nidulans	14
1.3.3 Fuentes de nitrógeno utilizadas por A. nidulans	17
1.4 Transportadores en A. nidulans	17
1.4.1 Regulación de la expresión de los transportadores de sustancias nitrogenadas en Aspergillus nidulans	17
1.4.2. Regulación de la endocitosis de transportadores de compuestos nitrogenados en Aspergillus nidulans.	19
1.4.3 UreA, el simportador de urea/H <sup>+</sup> de A. nidulans	21
1.4.4 Regulación transcripcional y post-traducciona l de UreA	22
1.4.5. Métodos de estudio para determinar la interacción UreA-ArtA	24
1.4.5.1 Ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC)	24
1.4.5.2 Co-inmunoprecipitación	25
<b>2. Objetivos</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo general	27
2.2 Objetivos específicos	27
2.2.1 Generación de las construcciones PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA_AF y PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA_AF por Fusion-PCR.	27
2.2.2 Clonado de las construcciones PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA_AF y PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA_AF en plásmidos comerciales para su secuenciación.	29
2.2.3 Sub-clonado de las construcciones verificadas por secuenciación en plásmido que posee el marcador auxotrófico pabaA.	30
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>31</b>
3.1 Generación de construcciones	31
3.1.1 Primera ronda de PCR: amplificación de los fragmentos a fusionar	31
3.1.2 Segunda ronda de PCR: fusión de los fragmentos amplificados	33
3.2 Clonado de las construcciones generadas en vector pJet	35
3.3 Secuenciación de las construcciones	38
3.4 Sub-clonado de las construcciones en vector Zero_blunt/pabaA.	39

<b>4. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>44</b>
<b>5. Materiales y métodos.</b>	<b>45</b>
5.1 PCR	45
5.1.1 Cebadores	45
5.1.2 ADN utilizados como molde para las PCR	46
5.1.3 Fusión-PCR	46
5.1.3.1: Primera ronda	46
5.1.3.2 Segunda ronda de amplificación	47
5.1.4 PCR de colonia	48
5.2 Electroforesis en gel de agarosa	49
5.3 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa	50
5.4 Vectores utilizados para clonado y subclonado	51
5.4.1 pJet 1.2	51
5.4.2 pZero_blunt/pabaA	52
5.5 Clonado	53
5.5.1 Ligación	53
5.5.2 Transformación de E.coli por shock térmico	54
5.5.2.1 Preparación de células quimiocompetentes	55
5.5.3 Transformación de E.coli por electroporación	56
5.6 Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina	56
5.7 Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción	57
<b>6. Bibliografía</b>	<b>58</b>
<b>7. Anexo</b>	<b>67</b>
Secuencia promotor PalcA	67
Secuencia artA	67
Secuencia tag HA-x3	68
Secuencia ter-cgrA_AF	68
Secuencia Construcción 1 (PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA_AF)	68
Secuencia linker artA-yfp-C	69
Secuencia yfp-C	69
Secuencia Construcción 2 (PalcA::artA::yfp-C::ter-cgrA_AF)	70

## Resumen

Un componente importante para el mantenimiento de la homeostasis celular y las respuestas al estrés, es la regulación de la composición de los transportadores en la membrana plasmática responsables de la absorción y exclusión de nutrientes, así como de otras moléculas pequeñas no permeables. Los mecanismos generales que controlan este proceso están altamente conservados entre los organismos eucariotas e involucran tanto la regulación transcripcional como la regulación del tráfico intracelular a través de la modulación del equilibrio de secreción, reciclaje y degradación de transportadores en respuesta a cambios en el entorno extracelular. En la regulación de este tráfico intracelular participan tanto elementos en *cis* como factores en *trans*.

El grupo en el cual se desarrolló este trabajo ha caracterizado un transportador de alta afinidad para la urea en *Aspergillus nidulans*, denominado UreA y codificado por el gen *ureA*. La regulación de este gen está sujeta a la represión metabólica por nitrógeno en presencia de fuentes preferenciales como el amonio o la L-glutamina. Asimismo la expresión de *ureA*, no es inducida por urea, sino que en ausencia de estas fuentes preferenciales de nitrógeno, se encuentra desreprimida.

Con respecto a la regulación post-traducciona de UreA, este es internalizado desde la membrana plasmática por endocitosis, en respuesta a la adición de amonio al medio de cultivo, para ser degradado en la vacuola. Se ha evidenciado que la proteína adaptadora ArtA es necesaria para su endocitosis, ya que mediaría la interacción entre el transportador y HulA, una ubiquitin-ligasa responsable de su ubiquitinación. Se han identificado dos lisinas (Lys689 y Lys693), en el extremo C-terminal de UreA, como posible blanco de ubiquitinación ya que al ser mutados el transportador no puede ser endocitado. También se identificó un posible sitio de unión de ArtA en el dominio C-terminal de UreA rico en aminoácidos básicos. Este posible sitio de unión se encuentra cercano a las lisinas candidatas a ser ubiquitinadas y la mutación de éste, impide la endocitosis de UreA.

En conclusión, hay evidencias de que UreA requeriría de ArtA para su ubiquitinación y posterior endocitosis. Además se ha identificado un posible motivo de reconocimiento entre UreA y ArtA, así como sitios de ubiquitinación en UreA. Esto indicaría entonces la existencia de una posible interacción entre ambas

proteínas. En consecuencia, el grupo de trabajo plantea utilizar dos estrategias para analizar esta posible interacción. En primer lugar un ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) y en segundo lugar una co-inmunoprecipitación. Para ello es necesario generar cepas que porten diferentes construcciones génicas (*PalcA-artA-yfp-C*, *PalcA-ureA-YFP-N* y *PalcA-artA-HAx3*). En este trabajo se generaron plásmidos portando dichas construcciones (excepto *PalcA-ureA-YFP-N*), para su posterior transformación en *A. nidulans*. Esto permitirá generar cepas que permitan realizar los ensayos mencionados anteriormente.

## Abreviaturas

AcK	Acetato de potasio
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
dNTP	2-Desoxinucleótidos 5-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
HCl	Ácido clorhídrico
Kb	Kilobases
LB	Caldo de lisogenia
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Buffer Tris EDTA
Tris	2-amino(2-hidroximetil) propano-1,3-diol
UV	Ultravioleta

# 1. Introducción

## 1.1 Transportadores de membrana

La membrana plasmática de todas las células y las membranas internas de los eucariotas contienen una amplia variedad de proteínas que aseguran el transporte transmembrana de solutos. Estas proteínas se pueden clasificar mecánicamente en canales o transportadores que, a su vez, se clasifican en transportadores activos primarios, secundarios y facilitadores, según sus requerimientos energéticos. Los transportadores activos primarios catalizan el transporte de metabolitos contra un gradiente de concentración utilizando la hidrólisis de ATP. Los transportadores activos secundarios son capaces de transportar iones y sustratos en la misma dirección o en la opuesta. Es decir, utilizan el movimiento de otra especie, comúnmente un ión ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ), siguiendo su gradiente electroquímico para transportar el sustrato en contra de su gradiente. Los facilitadores, por su parte, son transportadores pasivos o independientes de la energía que median el movimiento de un soluto a través de la membrana plasmática a lo largo de su gradiente de concentración (*Diallinas, 2007*).

De esta manera, los transportadores catalizan la entrada y salida de la mayoría de los metabolitos (compuestos nitrogenados, azúcares, vitaminas, etc) mientras que por el contrario, los canales median el transporte pasivo de iones formando un poro de difusión acuosa. A pesar de su similitud estructural, que consiste en una estructura altamente modular con, por lo general, entre 10 y 14  $\alpha$ -hélices transmembrana, dos propiedades distinguen a los canales de los transportadores. En primer lugar, el flujo de iones es extremadamente rápido en los canales. En segundo lugar los canales iónicos están cerrados y su frecuencia de apertura está regulada por cambios en el potencial de membrana, por la unión de un ligando específico o por limitaciones mecánicas como el estiramiento de la membrana. En contraposición, los transportadores experimentan cambios conformacionales reversibles que exponen su sitio de unión al soluto alternativamente en cada lado de la membrana. Se puede considerar que los transportadores de solutos actúan como enzimas (*Mirza et al, 2006; Klingenberg et al, 2007*) teniendo un sitio de unión



principal donde se unen sustratos en un lado de la membrana y esta unión provoca un cambio conformacional que expone el sitio de unión ocupado por el sustrato en el otro lado de la membrana, donde finalmente se liberan los sustratos (*Wadiche y Kavanaugh, 1998; Boyd et al, 2003*).

Por lo tanto, los transportadores son proteínas transmembrana que median la captación o salida selectiva de solutos, metabolitos, fármacos o iones a través de las membranas celulares. Sin embargo, a pesar de su inmensa importancia biológica en la nutrición celular, la comunicación, la señalización y la homeostasis, su estudio sigue siendo técnicamente difícil debido principalmente a su naturaleza hidrofóbica a causa de su localización celular. Además, el estudio de los transportadores eucariotas presenta una complejidad adicional debido a los múltiples mecanismos de control subcelular que operan para asegurar el tráfico de membrana, la localización en la misma y el recambio adecuado. A pesar de esto, los hongos modelo presentan, por su parte, herramientas genéticas únicas para estudiar la función de transportadores eucariotas (*Diallinas et al, 2016*).

## 1.2 Tráfico intracelular de transportadores de membrana

Principalmente se distinguen dos vías fundamentales de tráfico intracelular para los transportadores de membrana, la vía exocítica o biosintética y la vía endocítica o degradativa. En la vía exocítica los transportadores viajan desde el retículo endoplasmático (RE) hacia su membrana de destino donde cumplirán su función, mientras que normalmente en la vía endocítica los transportadores son conducidos a su degradación (Figura 1).

En eucariotas, los transportadores son insertados co-traduccionalmente en la membrana del RE. Sin embargo, el transporte eficiente desde el mismo no es un proceso predeterminado. La salida del RE depende no solo del plegamiento apropiado del transportador y de motivos de acción en *cis* (*Nishimura and Balch, 1997; Dominguez et al, 1998*) sino también de factores proteicos que actúan en *trans* (*Fromme and Schekman, 2005*). Una vez sintetizados en la membrana del RE, los transportadores se dirigen en vesículas al aparato de Golgi y de allí a la vacuola o a la membrana plasmática. Para aquellos transportadores que residen en la

membrana plasmática, uno de los mecanismos más utilizados y efectivos en cuanto su regulación post-traducciona es la internalización por endocitosis desencadenada por la ubiquitinación de los transportadores, la cual lleva a la degradación de los mismos por la vía vacuolar (André y Haguenauer-Tsapis, 2004; Dupré et al, 2004).

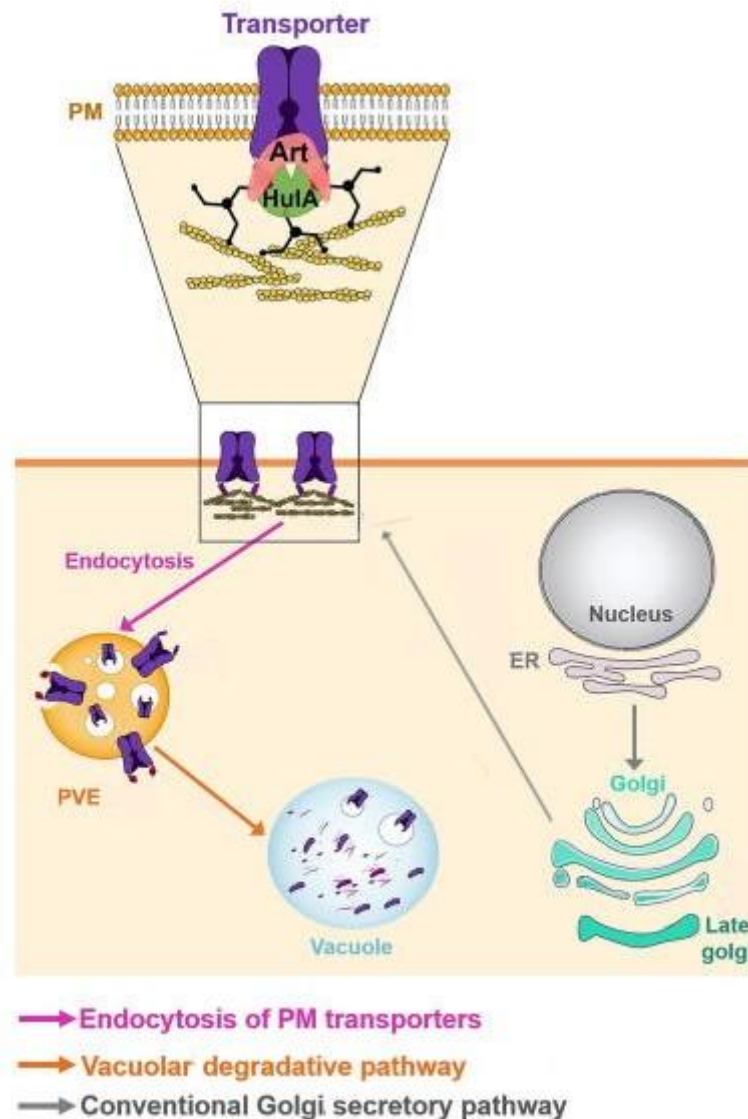


Figura 1: Esquema del tráfico intracelular de los transportadores de membrana plasmática. Tomado y modificado de Barata-Antunes et al, 2021. ER: retículo endoplasmático; PVE: vía de degradación vacuolar; PM; membrana plasmática; ArtA y HulA son arrestina y ubiquitin ligasa respectivamente (ver texto).

Estos procesos, son dinámicos y se encuentran estrictamente regulados ya que dependen directamente del estado fisiológico de la célula y de varias respuestas al estrés como; temperatura, envejecimiento, sobrecarga con exceso de sustrato,

preferencia de un metabolito alternativo debido a cambio repentino en la composición de los medios, etc (*Tavoularis et al, 2001; Valdez-Taubas et al, 2004; Pantazopoulou et al, 2007*).

Así pues, tanto la degradación como la síntesis de transportadores son procesos cruciales. La supervivencia celular frente a los cambios ambientales requiere el mantenimiento de un equilibrio dinámico (homeostasis) que necesita de un balance estricto entre ambos procesos. En este trabajo nos centraremos en la degradación de transportadores de membrana.

### 1.2.1 Ubiquitinación

La ubiquitinación por enzimas denominadas ubiquitin-ligasas es una de las formas por las que se da el proceso de marcado para la endocitosis de proteínas de membrana (*Reggiori y Pelham, 2002*). Se trata de una modificación post-traducciona, reversible, que consiste en la conjugación de una pequeña proteína llamada ubiquitina, de solo 76 aminoácidos, a una proteína blanco, normalmente en algún residuo de lisina. Debido a que la ubiquitina en sí misma posee 7 lisinas en su secuencia, ella misma puede ser ubiquitinada generando oligómeros de ubiquitina. El largo de la cadena de ubiquitina generado es normalmente de suma importancia para el destino final de la proteína ubiquitinada (*Léon et al, 2009*). La ubiquitinación de proteínas requiere de la acción sucesiva de varias enzimas, en primer lugar una enzima activadora de ubiquitina (E1), en segundo lugar de una enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y finalmente una ligasa de ubiquitina o ubiquitin-ligasa (E3) (*Kerscher et al, 2006*). Además, esta conjugación se da gracias al reconocimiento de motivos peptídicos (e.g. EK, KE, DXK, KXXE, KXXD, KXXXXXR y RXXXXXXXXK, en donde X es cualquier aminoácido) presentes en las proteínas blanco (*Chu et al, 2015*).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la ubiquitinación de transportadores de membrana plasmática depende casi exclusivamente de Rsp5p. Esta ubiquitin ligasa perteneciente a la familia HECT (*Rotin et al, 2009*) posee motivos WW (al igual que todas las ubiquitin ligasas de esta familia). Gracias a estos motivos, Rsp5p es capaz de reconocer transportadores de membrana con motivos PxY. Sin embargo, la mayoría de las proteínas de membrana carecen de estos motivos. Por tanto, el modelo corriente propone que las proteínas de membrana son reconocidas por

diferentes adaptadores que marcarían qué transportador y en respuesta a qué estímulo serían endocitados (*Mittal et al, 2009; Nikko et al, 2009; Reider et al, 2011*). En el caso de los transportadores de nutrientes, los adaptadores de la familia de las arrestinas tienen un rol fundamental, ya que serían las encargadas de mediar la interacción de los transportadores con las ligasas de ubiquitina a través de motivos PxY presentes en la proteína adaptadora (*Mittal et al, 2009; Nikko et al, 2009*).

### 1.2.3 Adaptadores

Las proteínas adaptadoras interactúan con los transportadores generalmente en sus extremos N o C-terminales (bajo ciertos estímulos) y son reconocidas por ubiquitin-ligasas a través de los motivos mencionados anteriormente (*Karachaliou et al, 2013; Nikko et al, 2008; Mittal et al, 2009*). Esto permite a las ubiquitin-ligasa ubiquitinar los transportadores etiquetándolos para su degradación.

Las proteínas del tipo arrestina son adaptadores cruciales para el tráfico de transportadores de nutrientes y para los receptores de señalización (*Lefkowitz and Shenoy, 2006; Ma and Pei, 2007*). La familia de arrestinas puede ser dividida en dos subclases, las  $\alpha$ -arrestinas que son más antiguas y las  $\beta$ -arrestinas que evolucionaron más recientemente. Ambas subclases poseen una estructura similar pero las  $\beta$ -arrestinas contienen un dominio conservado con motivos de interacción con clatrina mientras que las  $\alpha$ -arrestinas tienen dominios con motivos PxY que se unen a motivos WW de interacción proteína-proteína presentes en ligasas de ubiquitina (*Mittal et al, 2009*).

Aunque hay pocas  $\alpha$ -arrestinas conocidas en mamíferos (entre ellas TXNIP y Arrdc1-Arrdc5) y cerca de 12 en *S. cerevisiae* (Art 1-Art 10 y Bul 1-Bul 2), estas proteínas comparten estructuras conservadas (*Lin et al, 2008; Nikko et al, 2009; O'Donnell et al, 2010, Álvarez et al, 2008*). En el extremo N-terminal contienen dominios del tipo arrestina y en el extremo C-terminal poseen múltiples motivos PxY. Concretamente en levaduras, que no poseen  $\beta$ -arrestinas, las proteínas Art mostraron ser adaptadores para la ubiquitin-ligasa Rsp5 de manera que estas puedan interactuar con extremos terminales de receptores transmembrana (*Lin et al, 2008; Liu et al, 2007; Herrador et al, 2010*). Sin embargo, no todas las proteínas del tipo  $\alpha$ -arrestinas tienen funciones en la membrana celular, sino que alguna de ellas como Art 6 y Art 3 (también llamadas Aly 1 y Aly 2 respectivamente) cumplen

funciones en el reciclaje de transportadores, participando del tráfico desde endosomas hacia el complejo de Golgi (*O'Donnell et al, 2010*).

Rsp5 es esencial para la viabilidad en levaduras y juega un papel central en casi todos los procesos de tráfico dependientes de ubiquitina (*Belgareh-Touzé et al, 2008*). Los motivos PxY en proteínas Art interactúan con dominios WW de Rsp5 permitiendo la ubiquitinación de proteínas de membrana blanco para su endocitosis.

Por otra parte, muchos adaptadores son ubiquitinados por la ligasa que se encuentran regulando. Por ejemplo, algunos adaptadores de Rsp5 (Bsd2, Tre1/Tre2, Ear1/Ssh4) son ubiquitinados por Rsp5 y en consecuencia son reconocidos para la degradación vacuolar de los mismos (*Hattema et al, 2004; Stimpson et al, 2006; León et al, 2008; Lin et al, 2008; Nikko et al, 2009; MacGurn et al, 2011*). De esta manera el nivel de adaptadores en el medio depende de la disponibilidad de la ubiquitin-ligasa Rsp5.

Asimismo, algunos miembros de las  $\alpha$ -arrestinas también se encuentran ubiquitinados, pero no son degradados sino que dependen de esta modificación post-traducciona para cumplir su función. Por ejemplo, Art 2/Ecm21 y Art 8/Csr2 son proteínas adaptadoras tipo arrestina con elementos PY que reconocen el transportador de manganeso Smf1 en levaduras. Su ubiquitinación requiere de estas proteínas adaptadoras pero, a su vez, Art2/Ecm21 y Art8/Csr2 son sustratos de Rsp5 (*Nikko et al, 2008; Peng et al, 2003; Kee et al, 2006*). Sumado a esto, se ha visto que Art2 y Art8 también pueden asociarse con la enzima de deubiquitinación, Ubp2, lo que sugiere que se pueden dar rondas de ubiquitinación y deubiquitinación para modular la función de los adaptadores (*Léon et al, 2009*). A modo de ejemplo, la endocitosis de Smf1 requiere de la ubiquitinación de dos lisinas Lys 33 y Lys 34 ya que al ser mutadas no se detecta ubiquitinación ni endocitosis del transportador (*Nikko et al, 2008*). Por tanto en levaduras la ubiquitinación de Smf1 y la asociación con arrestinas proporciona una señal de endocitosis (*Nikko et al, 2008*).

## 1.3 *Aspergillus nidulans* como modelo para el estudio del tráfico intracelular de transportadores

### 1.3.1 Presentación del organismo

*Aspergillus nidulans* es un hongo multicelular utilizado ampliamente en laboratorios para el estudio de procesos biológicos. Aunque la levadura *S. cerevisiae* es comúnmente empleada como modelo eucariota, este organismo no es representativo de *Aspergillus* ni de otras familias de ascomicetos. A diferencia de *S. cerevisiae*, *A. nidulans* es un ascomiceto filamentoso que produce esporas sexuales, es aerobio obligado y posee un ciclo sexual bien definido permitiendo análisis genéticos. Su genoma consta de ocho cromosomas, es haploide y el tamaño es relativamente pequeño, tan solo 30 Mb. Al ser haploide permite una fácil selección de mutantes y un análisis mendeliano en una sola generación. Debido a su extenso reconocimiento como modelo génico, su genoma está completamente secuenciado (*Galagan et al, 2005*) y se encuentra disponible en <http://www.aspergillusgenome.org/>.

También presenta varias ventajas como modelo, una de las cuales es la gran versatilidad metabólica lo que permite tener un gran número de sistemas para estudiar catabolismo y anabolismo. Ha sido fuente de estudio en polaridad celular, ciclo celular, metabolismo y procesos de reparación de ADN (*Momany et al, 2002; Osmani et al, 1988; Osmani et al, 2004; Brambl et al, 2004*). Otras características importantes del organismo son: la capacidad de generar mutantes auxotróficos y por tanto un cepario, crecimiento vegetativo con dos ciclos de reproducción (sexual y asexual) y un crecimiento rápido produciendo grandes cantidades de biomasa. Sumado a esto, *A. nidulans* tiene la ventaja de producir conidias mononucleares permitiendo la propagación clonal y la purificación rápida de mutantes, transformantes y la progenie generada por cruza (*Todd et al, 2007*).

Asimismo, posee requerimientos nutricionales simples y es adecuado para realizar ensayos en placas de petri lo que permite detectar fenotipos intermedios de crecimiento. Por ejemplo, se pueden mutar transportadores de membrana y analizar los distintos fenotipos del organismo para obtener información sobre el transporte de metabolitos. Los transportadores mutantes con baja afinidad por el sustrato pueden seleccionarse como mutantes que carecen de un transporte eficiente y, por tanto, no

pueden crecer en medios apropiados a baja concentración de sustrato, pero que permiten el crecimiento a concentraciones mayores de sustrato. Las mutaciones que afectan la afinidad por determinado sustrato pueden ser incluso más fáciles de seleccionar como mutantes que permiten el crecimiento en un sustrato dado pero no en otro, o como mutantes que conducen a la resistencia a un análogo tóxico y al mismo tiempo permiten el crecimiento en sustratos fisiológicos. Todos estos enfoques genéticos son complementarios y han llevado a conclusiones importantes sobre las relaciones estructura-función del transportador de nitrato NtrA, el transportador de prolina PrnB, el transportador de ácido úrico / xantina UapA y el transportador de urea, UreA (*Diallinas et al, 2007; Sanguinetti et al, 2014; Tavoularis, et al, 2003*).

Por último, existen métodos de transformación eficientes, permitiendo clonar genes por complementación, sobreexpresar genes, realizar reemplazos génicos e inactivar genes. Además puede utilizar diversas fuentes de nitrógeno como la urea, prolina, glutamina, nitrato y amonio (*Darlington et al, 1965; Scazzocchio & Darlington, 1968*).

### 1.3.2 Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

El ciclo de vida de *A. nidulans* incluye una serie de vías de desarrollo estrictamente reguladas, desde la germinación de conidias o ascosporas hasta la formación de estructuras complejas como los cleistotecios o los conidióforos.

Principalmente se pueden seguir dos vías de desarrollo diferentes: la sexual (Figura 2, color rosa) y la asexual (Figura 2, color lavanda). En la primera, la meiosis da la formación de ascos que contienen ascosporas contenidas en cleistotecios. Cada cleistotecio contiene más de 10000 ascosporas que son la progenie meiótica de una única hifa ascógena (*Pontecorvo et al, 1953; Scazzocchio, C. 2019*).

Por otra parte, el desarrollo asexual se inicia mediante la germinación de una ascospora que por mitosis crece hasta formar hifas. De las mismas surge una primera serie de células que se diferencian para posteriormente generar estructuras llamadas metulae de donde brotan dos o tres fiálides. Desde la fiálide (yema de conidios no nucleares) se forma el conidióforo maduro que generará conidios mononucleares (*Scazzocchio, C. 2019*). Así ocurre un proceso altamente coordinado,

que involucra la regulación de la mitosis, la migración nuclear, la formación de septos y finalmente la aparición de una estructura altamente polarizada, el conidióforo.

Entonces *A. nidulans* puede crecer como hifas filamentosas vegetativas haploides después de la germinación de conidias uninucleadas o por ascosporas binucleadas. Pero también puede suceder que las hifas vegetativas de dos individuos puedan fusionarse para formar heterocariontes (células multinucleadas con núcleos genéticamente diferentes), los núcleos en un heterocarionte o un homocarionte (células nucleadas con núcleos genéticamente idénticos) puede a su vez fusionarse para formar una célula diploide (ciclo parasexual, ver Figura 2, color amarillo) (Todd et al, 2007). Por tanto *A. nidulans* posee tres ciclos de vida bien definidos, el ciclo sexual, el ciclo asexual y el ciclo parasexual.



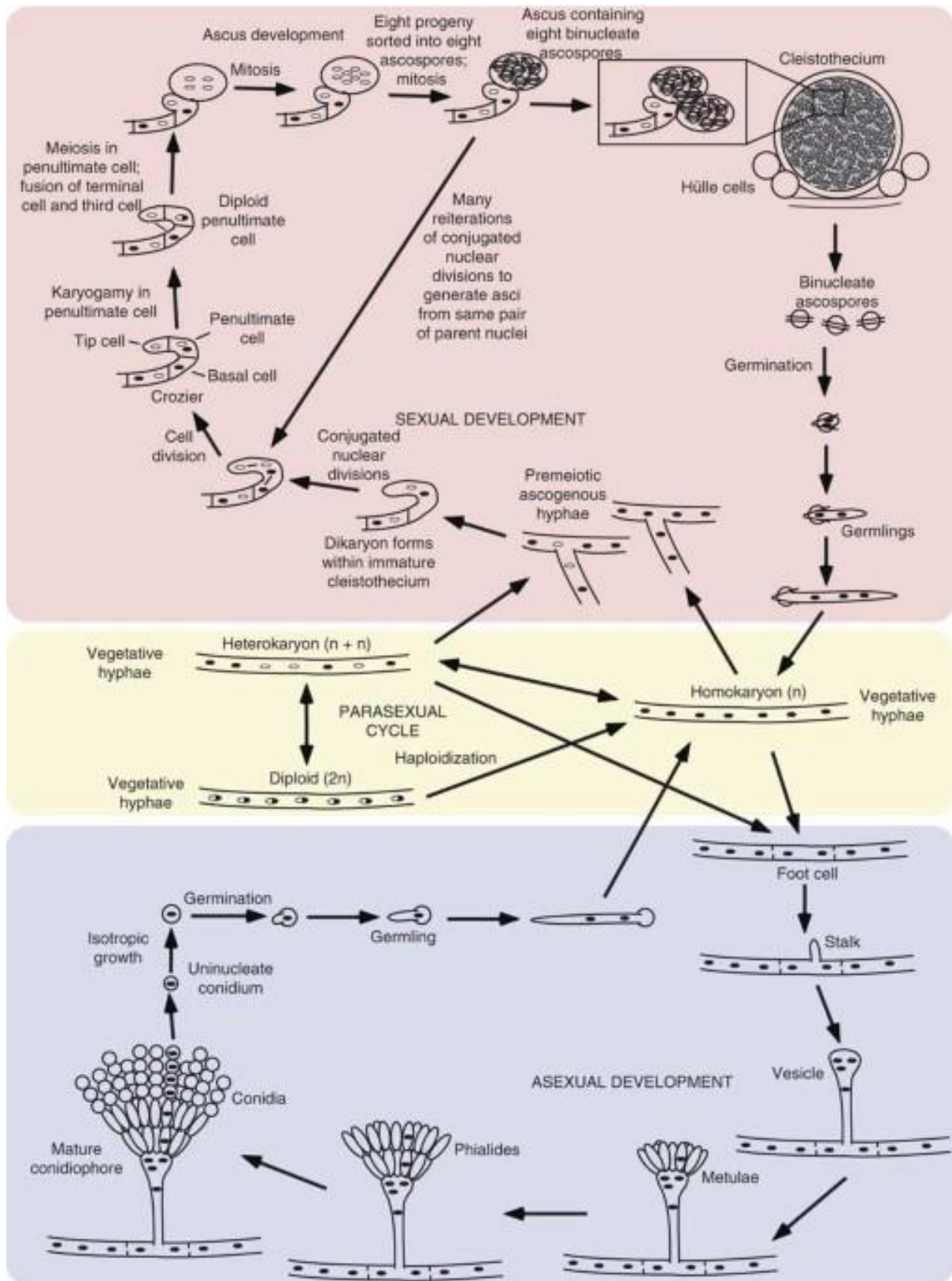


Figura 2: Esquema del ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* con las tres principales etapas del mismo, el crecimiento sexual (rosa), el ciclo parasexual (amarillo) y el desarrollo asexual (lavanda). Figura tomada de (Todd et al, 2007).

### 1.3.3 Fuentes de nitrógeno utilizadas por *A. nidulans*

*A. nidulans* es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de nitrógeno. Entre ellos se encuentra el amonio, aminoácidos, nitrato, nitritos, amidas, urea y purinas como la adenina, hipoxantina, guanina y xantina. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno son equivalentes ya que el amonio y la glutamina son fuentes preferenciales o primarias, mientras que las otras son fuentes secundarias o no preferenciales (*Darlington et al, 1965; Scazzocchio & Darlington, 1968*).

## 1.4 Transportadores en *A. nidulans*

Desde la primera caracterización molecular del transportador específico de L-prolina (*PrnB; Sophianopoulou y Scazzocchio, 1989*), se han caracterizado varios sistemas de transporte en *A. nidulans*. De hecho, este hongo modelo posee ejemplos de todas las categorías de transportadores. Se estima que más de 700 genes, es decir, al menos el 7,1% del genoma total de *A. nidulans*, codifican para proteínas que catalizan el transporte de solutos e iones a través de las membranas. Esto hace que *A. nidulans* ocupe el segundo lugar en la lista de eucariotas solamente superado por *Cryptococcus neoformans* con un 7,3%. En las bacterias, los transportadores y canales pueden llegar hasta el 13,8%, superando el 11% la mayoría de las veces y existen porcentajes similares para Archaea. Sin embargo, en otros eucariotas, esto puede ser del 2%, como en el protozoo *Dictyostelium discoideum*, o entre el 3,4 al 4,1% en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, plantas y mamíferos (*Diallinas et al, 2007*).

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

La regulación de la expresión de transportadores de solutos es blanco de varios circuitos transcripcionales que controlan el metabolismo. La mayoría de los transportadores relacionados con el catabolismo están regulados por inducción de sustrato y represión general de metabolitos (*Wiame et al, 1985; Davis et al, 1993; Scazzocchio 1992; Wilson et al, 1998*). En *A. nidulans*, los ejemplos más estudiados

incluyen transportadores específicos para fuentes de carbono, como glucosa, etanol, fructosa, ácidos monocarboxílicos y fuentes de nitrógeno, como aminoácidos, GABA, purinas, urea, nitrato, amonio, etc. La inducción por sustrato de un transportador específico suele ser un requisito previo para la inducción eficaz de genes que codifican para las enzimas implicadas en la utilización de este sustrato. Sin embargo, en algunos transportadores, como UreA, no se requiere de la presencia del sustrato para su inducción (*Abreu et al, 2010*).

La represión de la síntesis de transportadores, por otro lado, se da por un mecanismo muy eficiente donde se reprime la síntesis por ausencia del inductor, y así se elimina la necesidad de sitios diana represores individuales en el promotor de genes que codifican para los mismos. Mientras que en algunos casos determinados genes que codifican para transportadores son reprimidos solo por falta del inductor (ejemplo; utilización de prolina; *Cubero et al, 2000*), en algunos otros casos, la ausencia del inductor opera de la mano con la represión directa de genes individuales (utilización de nitrato y purina; *Oestreicher y Scazzocchio 1993; Glatigny y Scazzocchio. 1995; Punt et al, 1995*), proporcionando un mecanismo de doble bloqueo más eficiente y versátil para la represión transcripcional (*Diallinas, 2007*).

Por otra parte, en presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno como el amonio o la L-glutamina, también opera un mecanismo de represión metabólica por nitrógeno. En éste, los genes codificantes para enzimas y transportadores que participan en el metabolismo de fuentes de nitrógeno, distintas de amonio o glutamina, se encuentran sujetos a una fuerte represión transcripcional en presencia de las mismas. Asimismo, estos genes están bajo control del activador transcripcional AreA, un factor general con motivos de dedos de zinc capaz de unirse al ADN y que regula la expresión de más de cien genes relacionados con la utilización de fuentes nitrogenadas (*Arst and Cove, 1973; Kudla et al, 1990; Caddick, 1992*). AreA es inhibido en la presencia de amonio o de L-glutamina en un medio de cultivo (*Kudla et al, 1990*) y por tanto incapaz de activar la transcripción de genes relacionados con la utilización de fuentes de nitrógeno no preferenciales. Por otra parte, distintas fuentes de nitrógeno pueden actuar como inductores de genes específicos involucrados en su metabolismo activando AreA, aunque, las fuentes nitrogenadas también son capaces de activar reguladores transcripcionales específicos de su propia vía metabólica. Por tanto, AreA puede actuar positivamente

en sinergia con los reguladores específicos de cada transportador (*Berger et al, 2006; Cecchetto et al, 2004; Cultrone et al, 2007; Diallinas et al, 1995*).

#### 1.4.2. Regulación de la endocitosis de transportadores de compuestos nitrogenados en *Aspergillus nidulans*.

En *A. nidulans* se caracterizaron transportadores de sustancias nitrogenadas para los cuales se ha demostrado un mecanismo de internalización por endocitosis mediado por ubiquitinación y posterior degradación en la vacuola en respuesta a cambios en el medio, como el agregado de amonio, fuente preferencial de nitrógeno (*Cecchetto et al, 2004; Koukaki et al, 2005; Tavoularis et al, 2001; Apostolaki et al, 2009; Valdez-Taubas et al, 2004; Abreu et al, 2010*). Se han descrito transportadores como UapA (ampliamente estudiado), UapC, PrnB y AgtA cuya endocitosis en respuesta a amonio se encuentra bajo el control de la proteína del tipo arrestina ArtA y es independiente del mecanismo de represión a nivel transcripcional (*Karachaliou et al, 2013; Cecchetto et al, 2004, Koukaki et al, 2005; Diallinas et al, 2008; Tazebay et al, 1997; Apostolaki et al, 2009*).

La proteína adaptadora ArtA, codificada por el gen *artA*, es esencial para la ubiquitinación y endocitosis del transportador de ácido úrico, UapA en respuesta a amonio (*Karachaliou et al, 2013*). En este se da un mecanismo de regulación negativa por endocitosis que es inducido por sustrato y mediado por la ubiquitin-ligasa Hula<sup>Rsp5</sup> (*Gournas et al, 2010*). Se ha visto que en respuesta a amonio ArtA es ubiquitinada en un residuo de lisina (Lys-343) y esta ubiquitinación es crítica para su función en la endocitosis de UapA. Esto se puede observar ya que los niveles de ArtA ubiquitinada (Art-Ub) aumentan en presencia de amonio comparado con controles utilizando otras fuentes de nitrógeno (*Karachaliou et al, 2013*). La ubiquitinación de la misma es mediada por Hula ya que en cepas carentes de *hula* no es posible detectar ubiquitinación de ArtA (*Karachaliou et al, 2013*). Asimismo, en un experimento en el cual se mutó los motivos PPxY de ArtA en un medio con amonio y con Hula, no se detectaron proteínas ArtA ubiquitinadas. Por tanto los motivos PY son esenciales para el reconocimiento de ArtA por parte de Hula y, por lo tanto, para su ubiquitinación.

UapA por su parte posee en su extremo C-terminal un residuo de lisina (Lys-572) el cual es ubiquitinado por Hula en condiciones de endocitosis (*Gournas et*

al, 2010). Cabe mencionar que en este extremo C-terminal también se encuentra un motivo di-acídico  $E^{545}V^{546}E^{547}$  que al ser sustituido por alanina provoca que UapA no pueda ser endocitado. Este motivo es por ende, requerido para la ubiquitinación de UapA y posiblemente sea el sitio de unión de ArtA (Karachaliou et al, 2013).

El modelo propuesto (Figura 3) establece que frente a amonio, ArtA es constitutivamente ubiquitinada aumentando los niveles de ArtA-Ub. Ésta tiene mayor capacidad de reclutamiento de HulaA en comparación con ArtA y es responsable de la endocitosis de distintos transportadores de fuentes de nitrógeno (Karachaliou et al, 2013). Por tanto ArtA se uniría al extremo C-terminal de UapA gracias al motivo di-acídico  $E^{545}V^{546}E^{547}$  y a su vez la ubiquitin-ligasa HulaA reconocería ArtA a través de los motivos PY (PPxY) presentes en ésta. De esta manera, HulaA es capaz de ubiquitinar la lisina 572 de UapA y desencadenar su endocitosis. Además, se demostró que la ubiquitinación de UapA se da mientras la proteína se localiza en la membrana celular y no en los endosomas tempranos (Karachaliou et al, 2013).

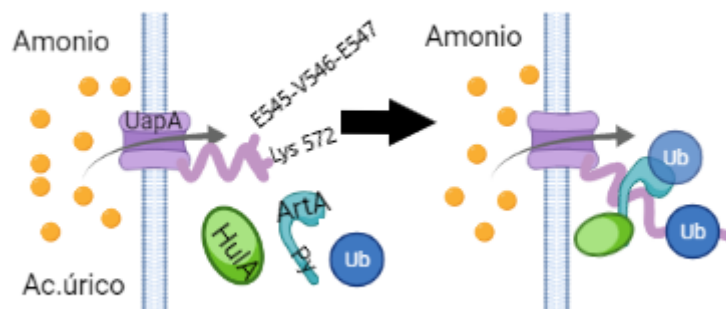


Figura 3: Esquema de la regulación del transportador UapA mediado por la proteína adaptadora ArtA y la ubiquitin ligasa HulaA en condiciones de endocitosis. Imagen generada con software BioRender®.

### 1.4.3 UreA, el simportador de urea/H<sup>+</sup> de *A. nidulans*

La urea (Figura 4) es utilizada como fuente de nitrógeno por plantas, animales, bacterias y hongos. Al ser una molécula altamente polar, la internalización de urea requiere de transportadores específicos.

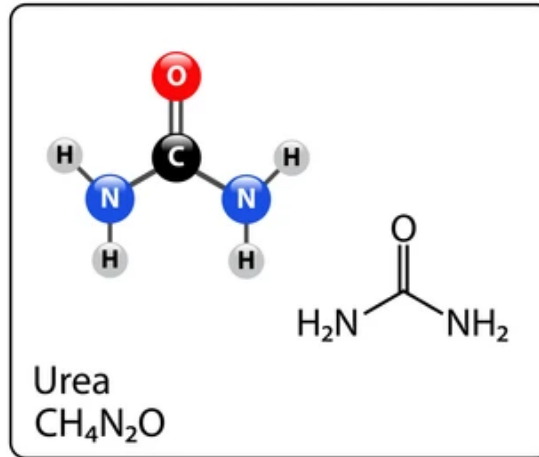


Figura 4: Estructura de la urea.

Las plantas y hongos poseen permeasas específicas para urea que son estructural y mecánicamente distintas a las que tienen los animales y bacterias. Un gran número de transportadores de urea han sido reportados en hongos y plantas. Estos transportadores están relacionados a la superfamilia de simportadores de sodio (SSS) y constituyen una subfamilia de H<sup>+</sup>-simportadores (Abreu *et al*, 2010). El primer transportador de urea caracterizado fue ScDur3 en *S. cerevisiae* el cual es parte de los simportadores urea/H<sup>+</sup> (ElBerry *et al*, 1993). Además se han identificado otros como; PiDur3 en *Paxillus involutus* (Morel *et al*, 2008), CaDur3 en *Candida albicans* (Navarathna *et al*, 2011), OsDur3 en *Oryza sativa* (Wang *et al*, 2012), ZmDur3 en *Zea mays* (Zanin *et al*, 2014) y AtDur3 en *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al*, 2003; Merigout *et al*, 2008).

En *A. nidulans*, se ha caracterizado un transportador de alta afinidad para la urea, denominado UreA, el cual es codificado por el gen *ureA* (Abreu *et al*, 2010). La proteína UreA está compuesta por 693 aminoácidos y posee quince dominios transmembrana predichos, donde el extremo C-terminal se localiza intracelularmente y el N-terminal hacia el medio extracelular. La secuencia de aminoácidos de UreA muestra un 51% de similitud con ScDur3, 45% con AtDur3 y 43% con PiDur3 (Abreu *et al*, 2010). El gen *ureA* posee tres parálogos en *A. nidulans* que no son

transportadores específicos de urea ya que en cepas que carecen del gen *ureA*, el crecimiento es residual cuando se utiliza urea como única fuente de nitrógeno (Abreu et al, 2010). Por otra parte, la tiourea es un análogo tóxico de la urea que también es transportada a través de UreA (Pateman et al, 1982, Abreu et al, 2010).

#### 1.4.4 Regulación transcripcional y post-traducciona de UreA

En *A. nidulans*, al igual que en otros hongos, los genes codificantes para enzimas y transportadores que participan en el metabolismo de fuentes de nitrógeno, distintas de amonio o glutamina, se encuentran sujetas a un fuerte control transcripcional. El transportador de urea no es la excepción, ya que no se expresa en presencia de amonio (Abreu et al, 2010).

En concreto la expresión de *ureA* fue estudiada en medios con distintas fuentes nitrogenadas como urea, arginina, nitrato de sodio, hipoxantina, prolina y acetamida. Se observó que el gen *ureA* no es inducido por urea pero, fuentes alternativas de nitrógeno producen distintos niveles de expresión lo que puede deberse a que son capaces de desreprimir diferencialmente su expresión. Sin embargo, el nivel más alto de expresión se da bajo condiciones de ausencia de fuentes de nitrógeno (Abreu et al, 2010). Por tanto el gen *ureA* se encuentra reprimido en presencia de fuentes nitrogenadas preferenciales (amonio y L-glutamina), desreprimido en ausencia de estas fuentes (prolina, acetamida, arginina, hipoxantina) y no es inducido por urea. También se demostró, que la transcripción de *ureA* es dependiente de AreA (Abreu et al, 2010).

Para el estudio de la regulación post-traducciona de UreA se generó una cepa que expresa la fusión UreA-GFP en lugar de la proteína salvaje. Dado que la GFP (*green fluorescent protein*) es una proteína fluorescente, la localización subcelular de UreA-GFP puede ser determinada por microscopía de fluorescencia. Cabe aclarar que la fusión a GFP no afecta la funcionalidad del transportador. Gracias a esta cepa se pudo observar que, en condiciones de desrepresión, UreA-GFP se localiza en la membrana y septos, y es internalizado desde la membrana plasmática por endocitosis, en respuesta a la adición de amonio (condiciones de represión metabólica) al medio de cultivo, para ser degradado en la vacuola (Abreu et al, 2010). Asimismo, mediante la generación de mutantes en el extremo C-terminal de UreA (que comprende los aminoácidos 639 a 693) fusionados a GFP, se pudo

determinar que se requiere de los aminoácidos 672 a 693 de UreA para la endocitosis en respuesta a la adición de amonio. Esto se pudo comprobar ya que la proteína UreA-GFP carente de esos aminoácidos permanece en la membrana plasmática sin capacidad de ser endocitada en esas condiciones. Consecuentemente, en esa región se identificaron dos lisinas (Lys689 y Lys693), como posible blanco de ubiquitinación ya que al ser mutadas individual y simultáneamente el transportador no es capaz de ser endocitado. Una de estas lisinas (Lys689), a su vez, podría ser parte de un motivo de ubiquitinación descrito previamente en *A. nidulans* (motivo EK; Chu et al, 2015)

Además se ha evidenciado que ArtA es necesaria para la endocitosis de UreA, ya que una cepa que carece de la misma ( $\Delta artA$ ) es incapaz de internalizar el transportador. También se identificó un posible sitio de unión de ArtA en el dominio C-terminal de UreA rico en aminoácidos ácidos (<sup>673</sup>DEESE<sup>678</sup>) y similar al observado para UapA, PrnB y AgtA (Karachaliou et al, 2013). Este posible sitio de unión se encuentra cercano a las lisinas candidatas a ser ubiquitinadas (Figura 5). La sustitución de este parche ácido por alaninas, impide la endocitosis de UreA.

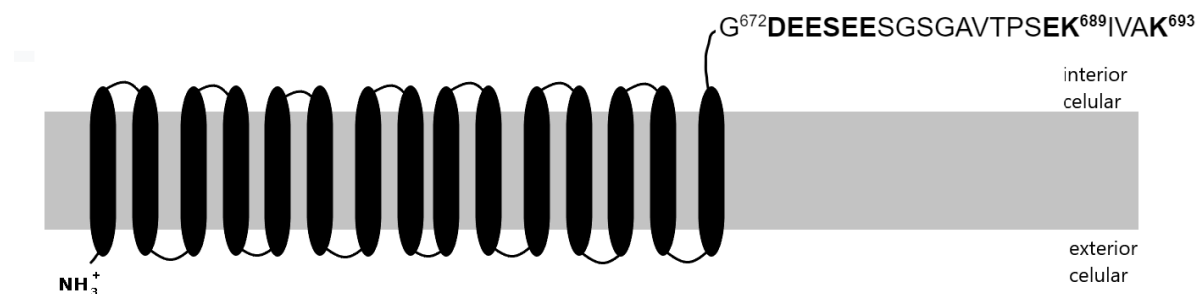


Figura 5: Esquema de UreA con 15 dominios transmembrana predichos y los últimos 21 aminoácidos de su secuencia C-terminal. Se remarca en negrita los motivos mencionados anteriormente.

En conclusión, hay evidencias de que UreA requiere de ArtA para su ubiquitinación y posterior endocitosis. Además se han reconocido posibles motivos de reconocimiento entre UreA y ArtA, así como sitios de ubiquitinación en UreA. Esto indicaría entonces la existencia de una posible interacción entre ambas proteínas.



## 1.4.5. Métodos de estudio para determinar la interacción UreA-ArtA

### 1.4.5.1 Ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC)

Un ensayo BiFC, es un método que se utiliza para visualizar directamente la interacción proteína-proteína *in vivo* o *in vitro* (Huang *et al*, 2008). Este ensayo se basa en la complementación de la fluorescencia mediante la reconstitución estructural de fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente (Kerppola, 2008; Shyu and Hu, 2008; Kodama and Hu, 2012). El remover un segmento de una proteína afecta comúnmente su plegamiento y estabilidad pero en muchos casos es posible reconstituir la estructura y funcionalidad de la misma. Esto es debido a que, a veces, la secuencia truncada puede retener suficiente información sobre su estructura nativa para formar enlaces específicos con la otra parte faltante (Hsien *et al*, 2016).

Este método posee la ventaja de ser relativamente sencillo de realizar y la fluorescencia reconstituida se puede observar en cualquier microscopio de fluorescencia equipado con filtros apropiados para la fluorescencia de la proteína elegida. Sin embargo, es necesario un análisis cuidadoso de la señal BiFC con el fin de interpretar correctamente los resultados. Esto se debe en gran parte al hecho de que dos fragmentos no fluorescentes de cualquier proteína fluorescente tienen tendencia a autoensamblarse, produciendo señales de fluorescencia de forma independiente de las correspondientes a la interacción proteína-proteína. Por tanto, es necesario que al diseñar experimentos BiFC se realicen controles apropiados (Kodama *et al*, 2013).

Entonces, es posible utilizar BiFC para determinar la posible interacción *in vivo* de la proteína adaptadora ArtA y el transportador UreA en condiciones de endocitosis, en *A. nidulans*. Esto se hace generando una cepa que co-exprese la fusión de UreA con la mitad N-terminal de la *yellow fluorescent protein* (UreA-YFP-N) y la fusión de ArtA con la mitad C-terminal de YFP (ArtA-YFP-C). Se espera que de haber interacción, la proteína YFP se reconstituya y se emita una señal de fluorescencia detectable por microscopía (Figura 6). Esto no sólo evidenciaría la interacción UreA-ArtA sino que también nos brinda información sobre la localización subcelular donde sucedería, la membrana plasmática. La cepa en la que se realice la co-transformación, idealmente, debe portar la delección del gen *artA* y del gen *ureA*

( $\Delta ureA$ ) y poseer la mutación *pabaA1*. Esto es debido a que el gen *pabaA* salvaje se utilizará como marcador de selección en los plásmidos que porten las fusiones *ureA-yfp-N* por un lado, y *artA-yfp-C* por otro. En este caso se utilizará a modo de control negativo cepas que portan las fusiones por separado. Es decir, una cepa que co-exprese la fusión UreA-YFP-N e YFP-C y otra cepa que co-exprese ArtA-YFP-C e YFP-N.

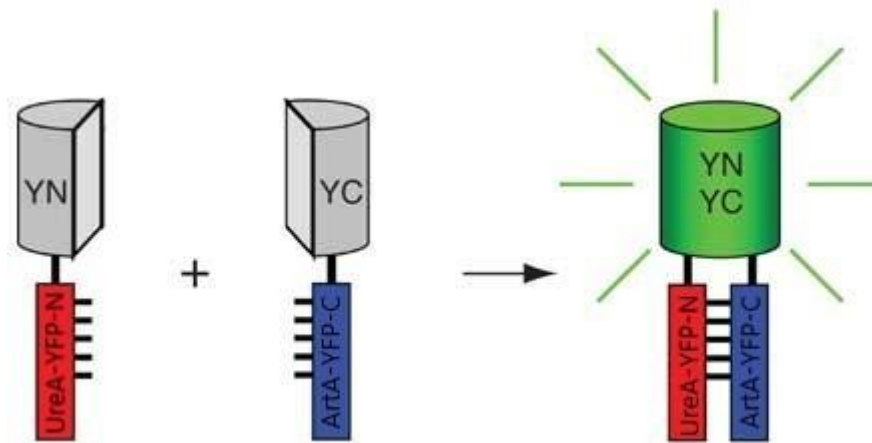


Figura 6 : Se muestra esquemáticamente la reconstrucción de la proteína YFP al unirse dos fragmentos C-terminal y N-terminal, emitiendo fluorescencia.

#### 1.4.5.2 Co-inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es una técnica por la cual se precipita un antígeno proteico utilizando un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o a un *tag* que porta la misma. Este proceso se puede utilizar para aislar y concentrar una proteína particular de una muestra que contiene muchas proteínas diferentes. La co-inmunoprecipitación funciona con anticuerpo específico que se dirige a una proteína conocida que se cree que es miembro de un complejo de proteínas o que se encuentra interaccionando con otras proteínas. Al interaccionar con esta proteína conocida es posible precipitar todo el complejo de proteína de la solución y así identificar proteínas desconocidas que se encuentren interaccionando con la proteína conocida de interés. Esto funciona cuando las proteínas involucradas en el complejo se unen entre sí estrechamente, sin embargo también se pueden fijar (mediante *crosslinking*) las interacciones proteína-proteína si es que éstas son débiles.

Con el fin de determinar la posible interacción entre las proteínas ArtA y UreA, es posible realizar una co-inmunoprecipitación. Para ello se requiere de una cepa que además de expresar la fusión UreA-GFP, exprese ArtA marcado con otro *tag*. En este caso el *tag* es HA, un péptido de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) provenientes de la proteína Hemaglutinina. Este *tag* es ampliamente utilizado en la expresión de vectores debido a que no interfiere con la actividad de las proteínas recombinantes y facilita la detección, aislamiento y purificación de las mismas. En este caso se utilizará este *tag* repetido tres veces (generando el *tag* HAx3) con la finalidad de que sea más fácilmente detectado por el anticuerpo anti-HA a utilizar. Por tanto, una vez generada la cepa se procede a la inmunoprecipitación de UreA-GFP con anticuerpos anti-GFP por un lado, y por el otro a la precipitación de ArtA-HAx3 con anticuerpos anti-HA. Luego mediante ensayos de Western blot se puede analizar la presencia de las distintas proteínas en los precipitados. Además hay que tener en cuenta que la transformación de una cepa de *A. nidulans* con la fusión *artA-HAx3* debe hacerse en una cepa que además de portar la fusión UreA-GFP, carezca del gen codificante para ArtA salvaje y tenga la mutación *pabaA1*. Esto es debido a que el plásmido con el cual se realizará la transformación no solo debe portar la construcción *artA-HAx3* sino que también tendrá el gen *pabaA* para utilizarlo como marcador de selección. Asimismo, debe verificarse que la construcción *artA-HAx3* sea capaz de complementar la carencia del gen *artA* endógeno y por tanto indicaría que el *tag* no afecta la funcionalidad de la proteína.

En consecuencia para realizar los ensayos de BiFC y co-inmunoprecipitación se requiere de la generación de tres plásmidos para transformar cepas de *A. nidulans*; *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF/pabaA* (para transformar en una cepa portadora de la fusión UreA-GFP y de la delección  $\Delta artA$ ); *PalcA::artA-yfp-C::ter-cgrA\_AF/pabaA* y *PalcA::ureA-yfp-N::ter-cgrA\_AF/pabaA* (para co-transformar en una cepa portadora de las delecciones  $\Delta ureA$  y  $\Delta artA$ ). El plásmido *PalcA::ureA-yfp-N::ter-cgrA\_AF/pabaA* ya fue generado en el laboratorio, por lo que no fue generado en este trabajo.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Generar plásmidos para crear cepas que permitan determinar si existe una interacción *in vivo* entre UreA y ArtA en condiciones de endocitosis.

### 2.2 Objetivos específicos

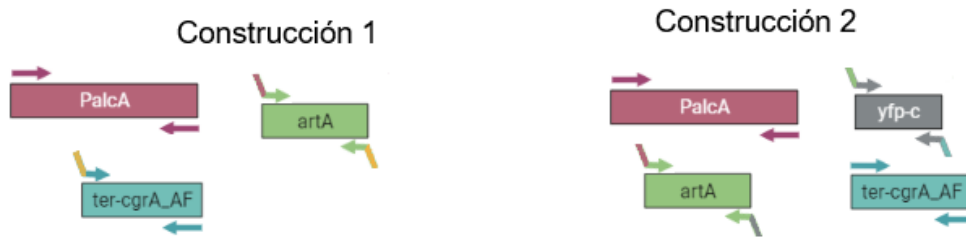
#### 2.2.1 Generación de las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* por Fusion-PCR.

Para el ensayo BiFC se utilizará la proteína fluorescente amarilla YFP, donde cada uno de los dos fragmentos (YFP-C-terminal y YFP-N-terminal) se fusionará a cada una de las proteínas de interés. Es decir, se necesitará de la generación de cepas que expresen ArtA-YFP-C y por otro lado UreA-YFP-N. Mientras que para la co-inmunoprecipitación se requiere de una cepa que exprese ArtA con un *tag* HA repetido tres veces (ArtA-HAx3) y UreA-GFP. Como se mencionó anteriormente, ya se posee una cepa que expresa UreA-GFP y el plásmido *PalcA::ureA-yfp-N::ter-cgrA\_AF/pabaA* ya fue generado en el laboratorio.

De esta forma solo se requiere generar las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* (construcción 1; C1) y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* (construcción 2; C2). En estas construcciones, *artA-HAx3* y *artA-yfp-C* se pondrán bajo control del promotor del gen *alcA* (*PalcA*, promotor inducible del gen *alcA* que codifica para la alcohol deshidrogenasa I en *A. nidulans*). El gen *alcA* es fuertemente reprimido cuando *A. nidulans* es cultivado con glucosa como fuente de carbono (*Bailey and Arst, 1975*), pero es fuertemente inducido cuando se cultiva en ausencia de glucosa y en presencia de etanol y otros alcoholes (*Creaser et al, 1985*). De este modo, a través de este promotor, es posible sobreexpresar las fusiones. Además se usará el mismo terminador de la transcripción para ambas construcciones, es decir, el terminador de la transcripción del gen *cgrA* de *Aspergillus fumigatus* (*ter-cgrA\_AF*) (*Meyer et al, 2011*).

Las construcciones se generarán mediante la técnica de Fusion-PCR (Szewczyk *et al*,2007) ampliamente aplicada en estos casos, que permite fusionar fragmentos de ADN sin tener que usar procedimientos de clonado convencionales. Para ello, en una primera ronda, se amplifican los fragmentos de interés por separado (utilizando cebadores híbridos que posteriormente nos permitan fusionar las distintas secuencias) y luego, en una segunda ronda, se realiza una PCR con cebadores “nested” dando como producto las fusiones deseadas. Se utilizarán este tipo de cebadores ya que permiten aumentar la especificidad y evitan obtener amplicones inespecíficos. Asimismo, estos cebadores poseen sitios de corte reconocidos por enzimas de restricción que facilitarán su posterior clonado en plásmidos (Figura 7). Por ende, se amplifican por PCR: el promotor *alcA* (*PalcA*) el gen *artA*, el terminador *cgrA\_AF* y la secuencia codificante para el fragmento YFP-C. La secuencia que codifica para el *tag* HAx3 no será amplificada sino que formará parte de la secuencia de los cebadores híbridos utilizados en la Fusion-PCR para la generación de la construcción *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF*.

## Primera ronda de amplificación de los fragmentos a fusionar



## Generando construcciones



## Segunda ronda: Fusion-PCR

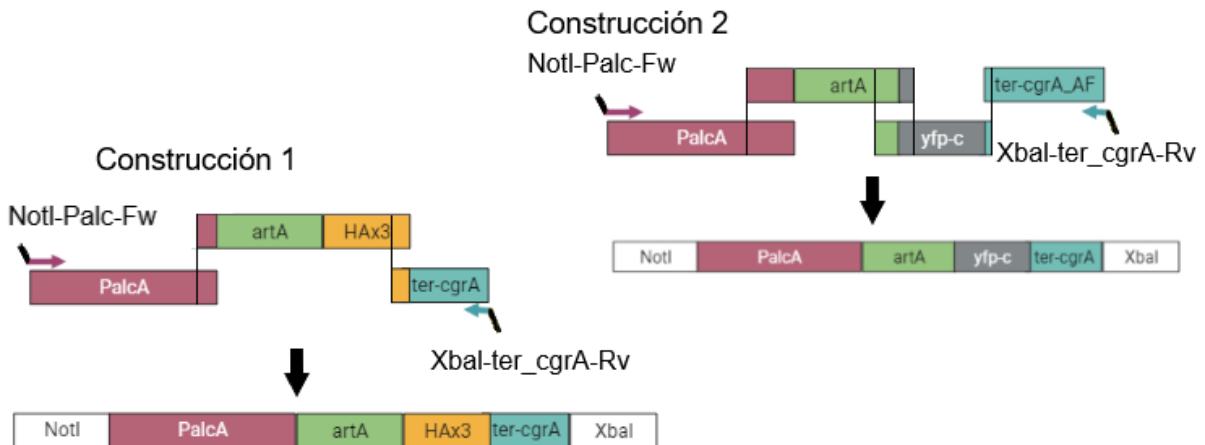


Figura 7: Esquema de la generación de las construcciones por Fusion-PCR. Se indican los primers "nested" los cuáles poseen sitios de reconocimiento para corte por enzimas de restricción NotI y XbaI. Imagen generada con software BioRender®.

2.2.2 Clonado de las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* en plásmidos comerciales para su secuenciación.

Con el fin de verificar que las fusiones generadas no presenten mutaciones, se clonarán en un plásmido comercial (Figura 8). De esta forma, se podrá secuenciar y verificar que las fusiones no presenten mutaciones antes de subclonaras en el plásmido que posee el marcador auxotrófico *pabaA*.

### 2.2.3 Sub-clonado de las construcciones verificadas por secuenciación en plásmido que posee el marcador auxotrófico *pabaA*.

Una vez verificadas las construcciones, serán subclonadas (mediante el uso de las enzimas de restricción *NotI* y *XbaI*) en un plásmido que porta un marcador de selección (gen *pabaA* de *A. nidulans*, que complementa la mutación *pabaA1* que causa la auxotrofia para el ácido para-aminobenzoico)(Figura 8). Luego se verificará el subclonado por PCR en colonia y análisis con enzimas de restricción.

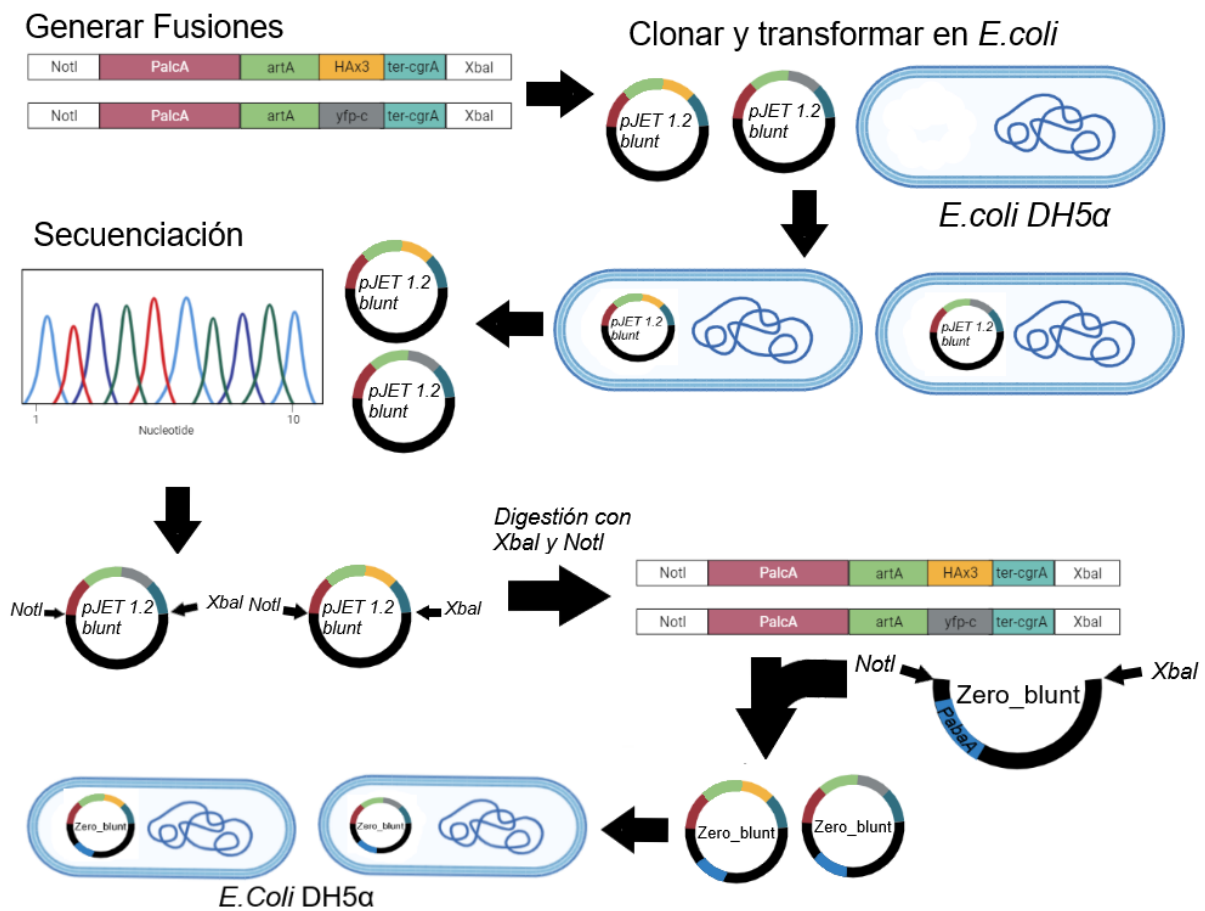


Figura 8: Esquema de la estrategia experimental. Se muestran las construcciones a generar, su clonado en el vector comercial *pJET* para su secuenciación y su posterior subclonado en el plásmido *Zero\_blunt* con *pabaA*. Imagen generada con software BioRender®.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Generación de construcciones

#### 3.1.1 Primera ronda de PCR: amplificación de los fragmentos a fusionar

Con el fin de generar las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* (construcción 1, C1) y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* (construcción 2, C2), se procedió a la amplificación de los fragmentos *artA*, *ter-cgrA\_AF* y *yfp-c* (ver Figura 7). La amplificación se realizó por PCR a tiempo final (ver Materiales y Métodos) y como ADN molde se utilizó el plásmido pFW 9.3 (*Wanka et al, 2016*) para amplificar el terminador de la transcripción *ter-cgrA\_AF*; el plásmido pDV8 (*Takeshita et al, 2008*) para amplificar *yfp-c* y ADN genómico extraído de la cepa MVD 10A para amplificar *artA* (la cepa MDV10A de *A. nidulans* posee el gen *artA* salvaje). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Figuras 9 y 10). El tamaño esperado de los fragmentos era de 1671 pb para *artA* C1, 1610 pb para *artA* C2, 333 pb para *yfp-c*, 328 pb para *ter-cgrA\_AF* C1 y 307 pb *ter-cgrA\_AF* C2. La diferencia de tamaño entre las secuencias *artA* de cada construcción se debe a que en el caso de la construcción 1, el cebador *reverse* contiene parte de la secuencia del *tag-HAx3*, por ello es más largo. Para el caso de los terminadores *ter-cgrA\_AF* sucede lo mismo, el terminador de la construcción 1 contiene más bases debido a que el cebador *forward* contiene en parte la secuencia del *tag-HAx3* (ver Materiales y Métodos). El promotor *PalcA* ya se encontraba amplificado en el laboratorio, por lo que no fue necesaria su amplificación.



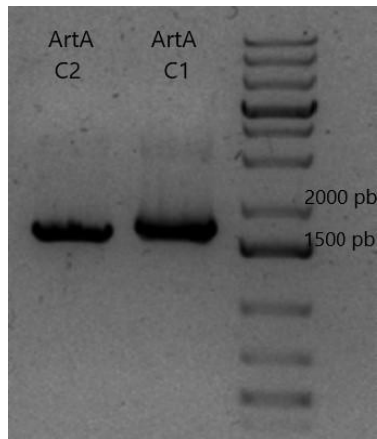


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1% para el análisis de los productos de la primera ronda de PCR indicados (3  $\mu$ L). Tercer carril: MPM 1kb plus (4  $\mu$ L).

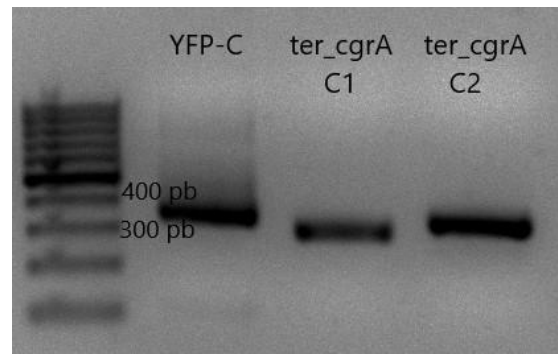


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% para el análisis de los productos de la primera ronda de PCRs indicados (3  $\mu$ L). Primer carril: MPM GeneRuler 100 pb (4  $\mu$ L).

Como se observa en las Figuras 9 y 10, se obtuvieron en todos los casos los productos de amplificación esperados. Posteriormente, se procedió a la purificación de los mismos. Se realizó la purificación cortando las bandas de gel ya que de esta forma podemos eliminar los cebadores libres de la reacción de PCR. Esto es debido a que los cebadores, de menor peso molecular y que no se ven en el gel, pueden interferir con el rendimiento de la fusión de los fragmentos, por lo que es preferible evitarlos. Luego de la purificación se cuantificaron las muestras con Nanodrop (Tabla 1) y la calidad de las mismas se analizó por electroforesis de agarosa (Figura 11 y 12).

Tabla 1: Datos obtenidos por Nanodrop luego de la purificación de los fragmentos amplificados.

Fragmento	Concentración (ng/ $\mu$ L)	$A_{260}$	$A_{260}/A_{280}$
artA (C1)	99,4	0,944	1,92
artA (C2)	83,4	1,668	1,89
yfp-c	124,6	2,491	2,17
ter-cgrA_AF (C1)	123,4	2,468	1,92
ter-cgrA_AF (C2)	47,2	0,944	1,92

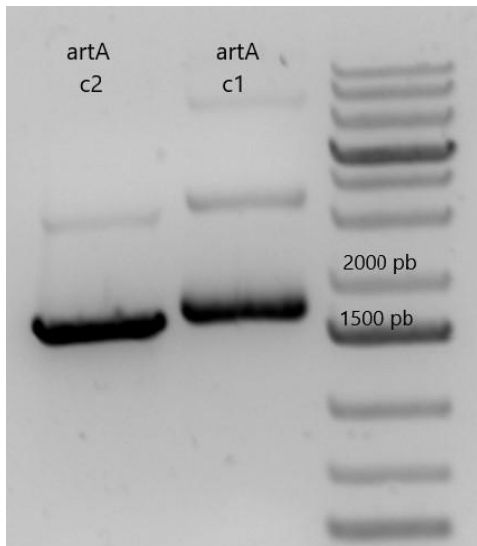


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se sembraron 3  $\mu$ L de los fragmentos purificados y 4  $\mu$ L de MPM (GeneRuler 1kb)

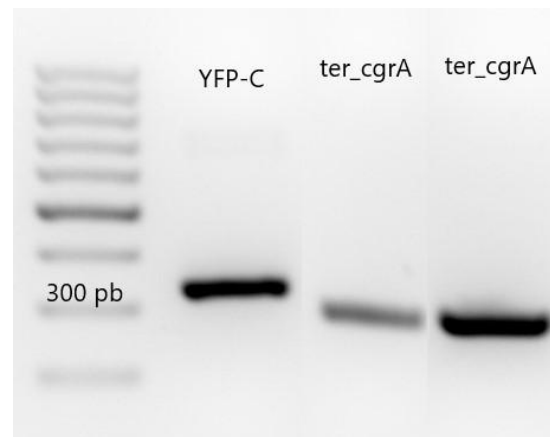


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se sembraron 3  $\mu$ L de los fragmentos purificados y 4  $\mu$ L de MPM (GeneRuler 100 pb)

En la Figura 11 no solo se observan los fragmentos purificados sino que también se observan bandas de mayor tamaño. Esto no debería de suceder ya que la purificación se realizó cortando las bandas de interés por lo que solo debería de tener bandas del peso esperado. Sin embargo, cabe la posibilidad de que durante la purificación de las bandas, la cual en parte se realiza a 55 °C, se hayan formado oligómeros y por ende se crean bandas con el doble o triple del tamaño esperado (el peso molecular de las bandas “extra” obtenidas apoyaría esta posibilidad). De todos modos, está claro que se obtuvieron bandas del tamaño esperado y que éstas son mayoritarias.

### 3.1.2 Segunda ronda de PCR: fusión de los fragmentos amplificados

Una vez obtenidos los fragmentos deseados, se procedió a realizar la fusión de los mismos por Fusión-PCR (Szewczyk *et al*, 2007) para generar las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* (C1) y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* (C2). Como se menciona anteriormente, el promotor *PalcA* requerido para ambas construcciones ya se encontraba amplificado y purificado en el laboratorio por lo que no fue necesario generar el amplicón. Para la fusión, los cebadores utilizados fueron *NotI-PalcA-Fw* y *XbaI-ter-cgrA-Rv* en ambos casos. Estos cebadores poseen el sitio de corte de las

enzimas *NotI* y *XbaI* respectivamente, los cuales serán utilizados para su clonado en el plásmido que porta el marcador de selección *pabaA* (vector Zero\_blunt/*pabaA*). El peso molecular esperado de la construcción 1 era de 2351 pb y para la construcción 2, 2633 pb. Se procedió a realizar la Fusión-PCR (ver Materiales y Métodos), la cual fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (Figura 13).

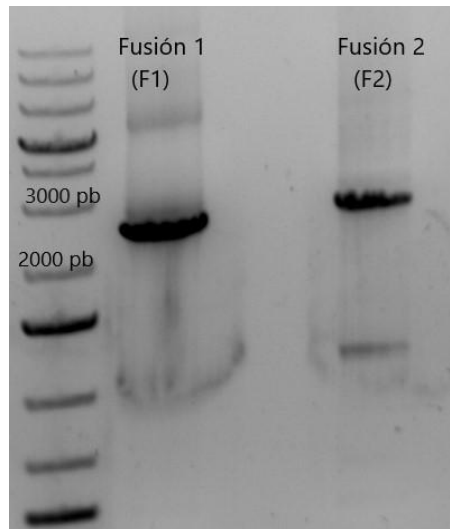


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 1% para el análisis de los productos de Fusión-PCRs indicados (3  $\mu$ L). Primer carril: marcador de peso molecular 1 kb plus (4  $\mu$ L).

Como se observa en la Figura 13, se obtuvieron las fusiones deseadas. Sin embargo, también se pueden observar bandas tenues de menor y mayor peso molecular. Por ende, se procedió a purificar por gel los productos deseados y luego se midió su concentración utilizando el Nanodrop (Tabla 2). Una vez purificadas las muestras se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (Figura 14) para confirmar la calidad de las mismas.

Tabla 2: Datos obtenidos por Nanodrop luego de la purificación de las fusiones.

	Concentración (ng/ $\mu$ L)	$A_{260}$	$A_{260}/A_{280}$
Fusión 1 (c1)	75,4	1,516	1,89
Fusión 2 (c2)	46,8	0,937	1,75

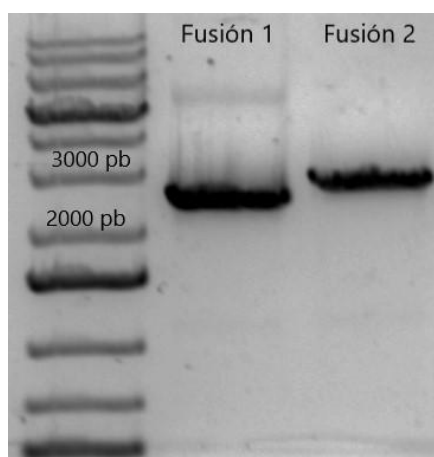


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de las fusiones previamente purificadas por banda (se sembraron 3  $\mu$ L de cada una). Primer carril: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb plus (4  $\mu$ L).

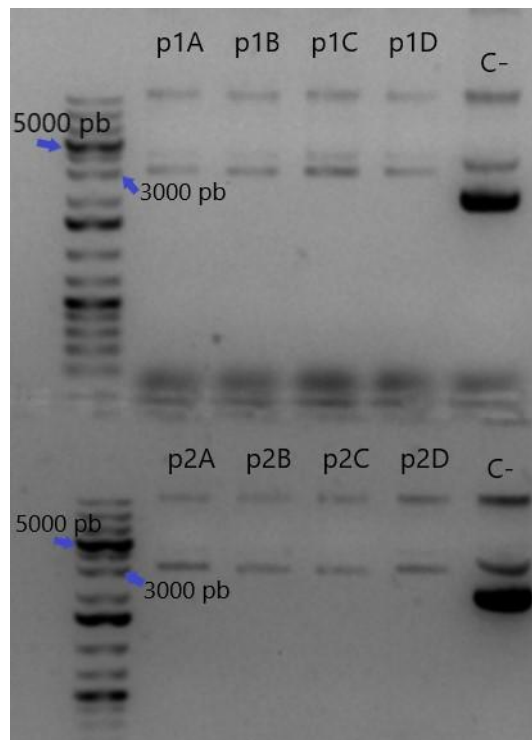
La purificación fue exitosa y se obtuvieron bandas del peso molecular esperado así como también disminuyeron o desaparecieron otras bandas observadas previamente. Sin embargo, se observa una banda de mayor tamaño en el carril de la fusión 1, lo cual podría ser explicado (como ya se mencionó anteriormente) por la formación de oligómeros durante la purificación. A pesar de esto, está claro que la banda mayoritaria es la del peso molecular esperado.

### 3.2 Clonado de las construcciones generadas en vector pJet

Con el fin de secuenciar las fusiones generadas para verificar que las mismas no posean mutaciones (producto del proceso de amplificación), se procedió a clonaras en un plásmido, pJet (ver Materiales y Métodos). Por tanto, una vez obtenidas las construcciones se procedió a la ligación de las mismas con el kit CloneJet (Thermo Scientific) que permite el clonado de moléculas de ADN con extremos romos (la ADN polimerasa utilizada en las reacciones de PCR, ver Materiales y Métodos, genera productos de amplificación con extremos romos). Cabe aclarar que el plásmido Jet contiene un gen letal en el sitio de clonado, el cual será interrumpido por la inserción de las fusiones. De este modo es más sencillo detectar clones candidatos a tener el inserto, ya que se espera que solamente puedan crecer, en medio selectivo, sólo aquellas colonias bacterianas que hayan adquirido plásmidos con inserto (lo que es indicativo de que el gen letal se fue

interrumpido y por tanto inactivado). Posteriormente se procedió a la transformación de células *E.coli DH5α* por *heat shock* (ver Materiales y Métodos). Se plaquearon las bacterias en medio LB con ampicilina como método de selección (pJet contiene gen *ampR*; confiere resistencia a ampicilina) y se seleccionaron 4 colonias resistentes a ampicilina para analizar si habían adquirido el plásmido deseado.

Se procedió a la realización de minipreparaciones de ADN plasmídico (ver Materiales y Métodos). Para comprobar que los plásmidos tuvieran el tamaño deseado se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 15). El tamaño esperado de los plásmidos con las construcciones es de 5298 pb y 5607 pb (para C1 y C2, respectivamente). Como control negativo se utilizó el plásmido pBluescript *ks(-)* que tiene un peso molecular de 2958 pb, similar a pJet (2974 pb).



*Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las minipreparaciones de ADN plasmídico realizadas. En la parte superior se sembró ADN plasmídico extraído de las colonias obtenidas de la transformación con la ligación de la construcción 1 + plásmido pJet (p1A-D). Mientras que en la parte inferior se sembró ADN plasmídico extraído de las colonias obtenidas de la transformación con la ligación de la construcción 2 + plásmido pJet (p2A-D). C- corresponde al plásmido KS Bluescript. El volumen de siembra fue 3  $\mu$ L. Primer carril (superior e inferior): marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb (4  $\mu$ L).*

Comparando la migración electroforética de los distintos ADN plasmídicos extraídos de los clones seleccionados con el control negativo (plásmido KS Bluescript), se observa que estos poseen un mayor peso molecular. Por tanto, son candidatos a tener las construcciones deseadas.

Para verificar esto se realizó una digestión de los mismos con enzimas de restricción. Al conocer la secuencia del plásmido Jet y de las construcciones, podemos predecir el patrón de restricción esperado (Tabla 3).

Se procedió a realizar la digestión de dos de los plásmidos correspondientes a cada construcción con *XhoI* (ver Materiales y Métodos). En concreto se analizaron los plásmidos 1C, 1D, 2C y 2D.

Tabla 3: Tamaño de bandas esperado para la digestión con *XhoI* del plásmido pJet con los insertos (construcción 1 y 2) dependiendo de la orientación de los mismos.

pJet C1 Orientación A'	pJet C1 Orientación B	pJet C2 Orientación A	pJet C2 Orientación B
926 pb	127 pb	958 pb	136 pb
1322 pb	1322 pb	1560 pb	1560 pb
≈3100 pb	≈3900 pb	≈3110 pb	≈3932 pb

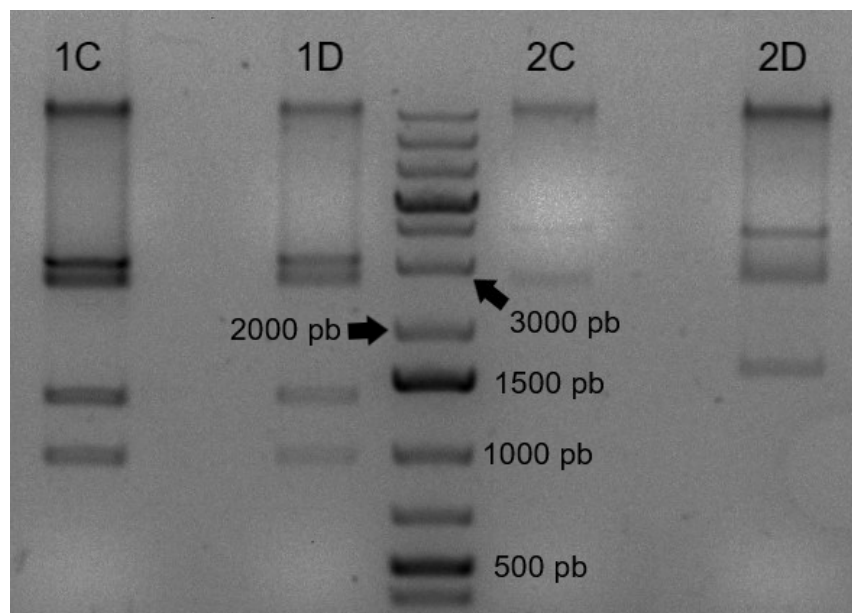


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de la digestión de los plásmidos candidatos a tener el inserto de interés con *XhoI*. Digestión de los distintos ADN plasmídicos. Carril en medio: marcador de peso molecular GeneRuler plus 1 kb (4  $\mu$ L).

Como se observa en la Figura 16, en todos los casos, la digestión de los plásmidos fue parcial y en el caso de 2C no hubo digestión. Para 1C y 1D se observan las tres bandas esperadas para la orientación A, además de una banda que migra un poco menos que la banda correspondiente a 3000 pb del MPM, que se correspondería con la conformación superenrollada del plásmido (ver Figura 15). En el caso de 2D, producto de la digestión parcial, no se observa la banda de menor peso molecular esperada (136 pb o 958 pb), pero si la banda de 1560 pb esperada. Es importante destacar que, como control, se debió sembrar ADN plasmídico sin digerir.

### 3.3 Secuenciación de las construcciones

A pesar de las digestiones parciales obtenidas, y dada la menor migración observada de los plásmidos analizados con respecto al plásmido KS Bluescript sembrado como control, se consideró que los plásmidos eran candidatos a tener las construcciones deseadas. Con el fin de obtener plásmidos de buena calidad para su secuenciación se procedió a realizar nuevas minipreparaciones plasmídicas (Figura 17 y Tabla 4).

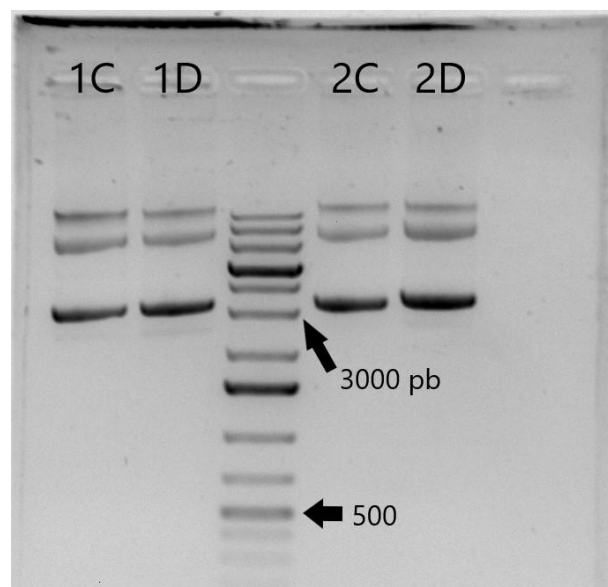


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa 1% de las minipreparaciones de los plásmidos 1C, 1D, 2C y 2D (3  $\mu$ L). Tercer carril: marcador de peso molecular GeneRuler plus 1 kb (4  $\mu$ L).

Tabla 4: Datos de concentración obtenidos por nanodrop para la extracción del plásmido Jet conteniendo las fusiones.

<i>plásmidos</i>	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
<i>p1C</i>	2039	40,78	1,95
<i>p1D</i>	1898	37,97	1,93
<i>p2C</i>	2045	39,57	2,01
<i>p2D</i>	2473	41,85	1,98

Estos plásmidos se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Seúl, Corea del Sur) utilizando los cebadores PalcA-seq, artA-seq1-Fw y artA-seq2-Fw (ver Materiales y Métodos). El plásmido 2D y 1D no presentaron mutaciones en la secuencia, mientras que 1C sí presentó mutaciones. En el caso del plásmido 2C no fue necesaria su secuenciación.

### 3.4 Sub-clonado de las construcciones en vector Zero\_blunt/*pabaA*.

Una vez verificado que las construcciones no presentaban mutaciones en su secuencia, se procedió al subclonado de las mismas en el plásmido Zero\_blunt/*pabaA*. Para ello, se realizó la digestión de los plásmidos 1D y 1C con las enzimas de restricción *Xba*I y *Not*I. Esto es posible gracias a los sitios de corte de estas enzimas incluidos en los cebadores que amplificaron las fusiones (ver Materiales y Métodos). Debido a que el tamaño de las construcciones (2351 y 2633 pb, C1 y C2 respectivamente) y de pJet (2974 pb) son similares se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para poder resolver correctamente ambas bandas (Figura 18).



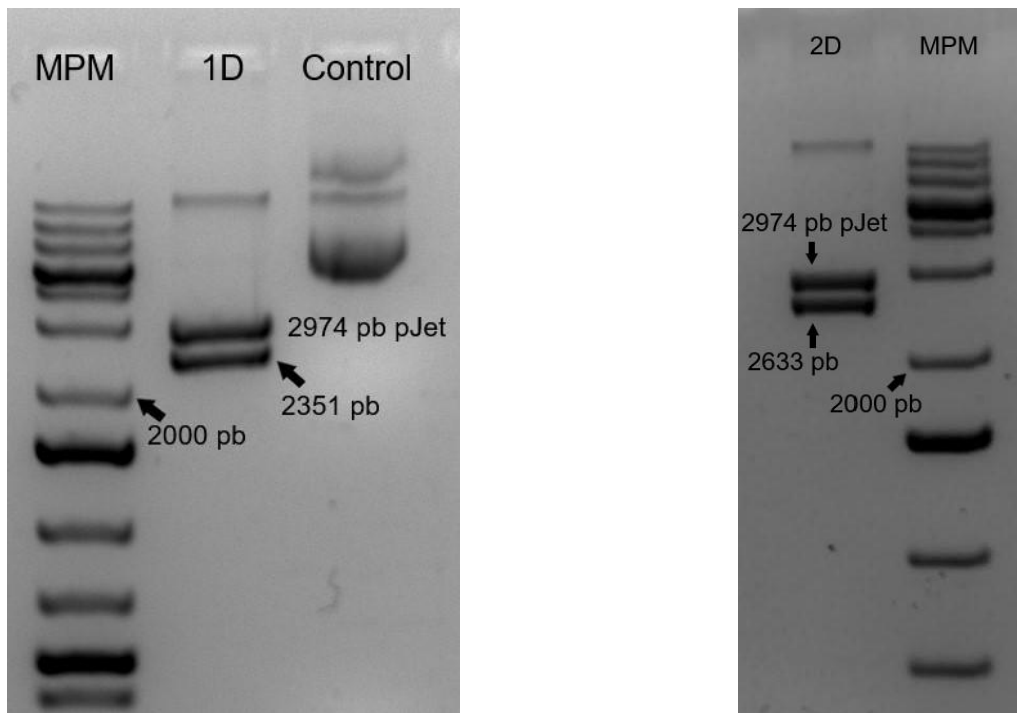


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de la digestión con *Xba*I y *Not*I de los plásmidos 1D y 2D. El control es el plásmido sin digerir y como MPM se utilizó GeneRuler plus 1 kb (4  $\mu$ L).

Como se observa en la Figura 18, en ambos casos se obtuvieron bandas de los pesos moleculares esperados. Además tanto para 1D como para 2D la digestión fue parcial.

Consiguientemente se purificó por banda, las bandas correspondientes a las construcciones y las mismas fueron cuantificadas por Nanodrop (Tabla 5).

Tabla 5: Datos de concentración obtenidos por Nanodrop para las construcciones purificadas por banda, luego de la digestión de 1D y 2D con *Xba*I y *Not*I.

Construcción	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
1	21,0	0,42	1,76
2	25,9	0,519	1,85

Una vez obtenidas las construcciones con los extremos cohesivos generados por el corte de *Xba*I y *Not*I, se procedió a la ligación de las mismas con el vector de interés Zero\_blunt/*pabaA*. Una vez realizadas las ligaciones se procedió a la transformación de las mismas por electroporación de células electrocompetentes *E.coli* DH5 $\alpha$  (ver Materiales y Métodos). Se seleccionaron 10 colonias resistentes a

kanamicina (el plásmido Zero\_blunt/pabaA posee un gen que confiere resistencia a este antibiótico) y se realizó PCR en colonia para determinar si poseían las construcciones de interés (Figura 19). Como controles positivos se utilizaron como molde para la PCR los plásmidos 1C y 1D. El peso molecular esperado para las PCR en colonia era de 1382 pb para la construcción 1 y 1610 pb para la construcción 2.

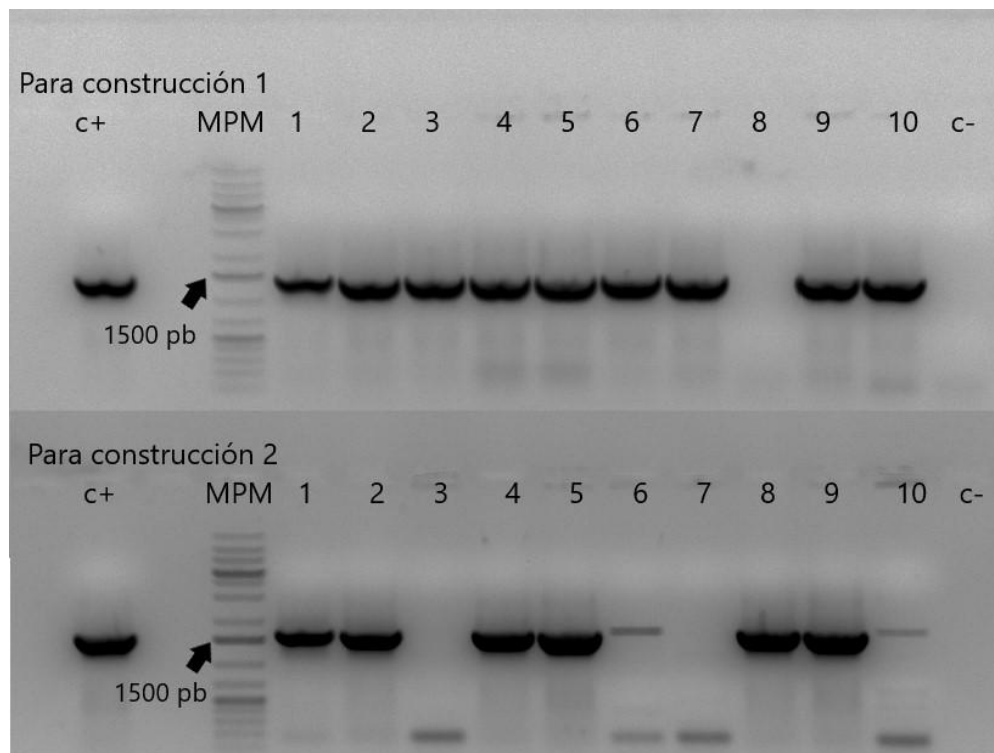


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de las PCR en colonia. Se muestran los resultados de PCR en colonia de las diez colonias seleccionadas luego de la transformación con la ligación del plásmido Zero\_blunt/pabaA con las construcciones deseadas. Los controles positivos (c+) corresponden a la PCR utilizando como molde los plásmidos 1D y 2D. Se sembró todo el volumen de la reacción de PCR (25 µL) y 4 µL del marcador de peso molecular GeneRuler plus 1 kb.

Como se observa en la Figura 19, muchas de las colonias tanto para la construcción 1 como para la 2 dieron positivo, observándose producto de amplificación. Por tanto, se procedió al cultivo de las colonias positivas (1-6 de la construcción 1; 1,2,4,5,8 y 9 para la construcción 2) en medio LB con kanamicina para la extracción del ADN plasmídico (Figura 20).

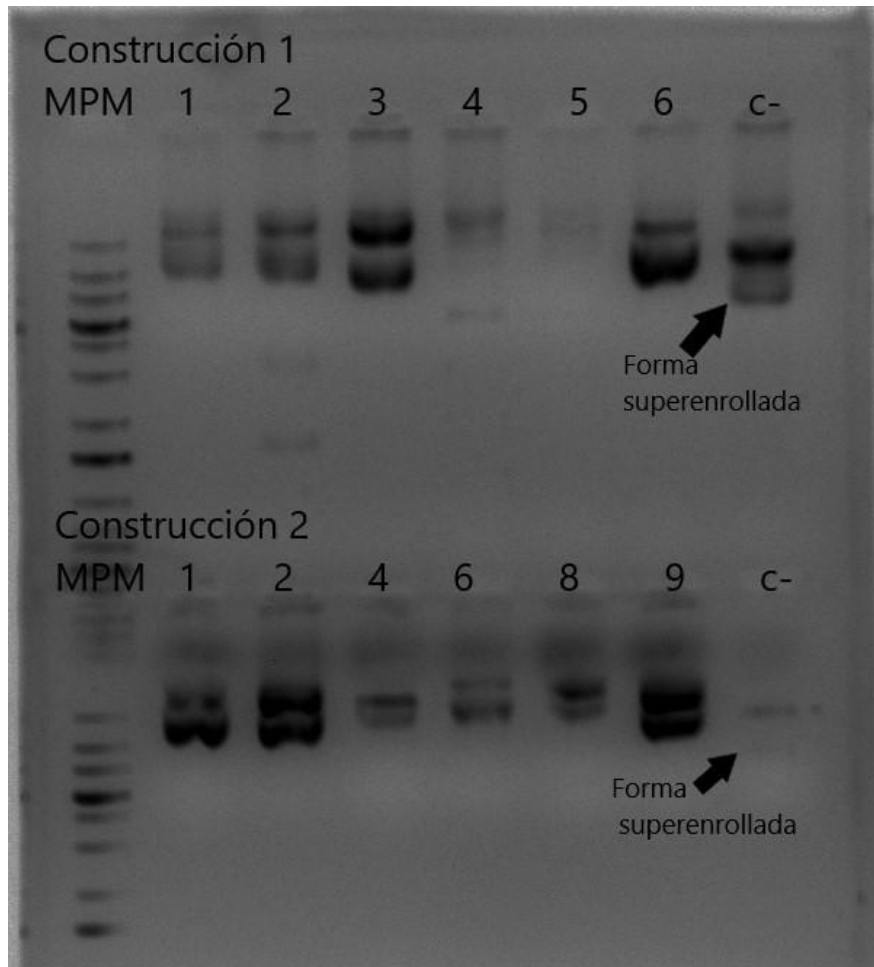


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de los plásmidos extraídos de las colonias positivas por PCR en colonia. El control negativo corresponde al plásmido Zero\_blunt/pabaA sin inserto. El volumen de siembra fue de 3  $\mu$ L para las muestras y 4  $\mu$ L de MPM (GeneRuler plus 1 kb).

Todos los plásmidos extraídos migraron menos que el plásmido control por lo que confirman la presencia del inserto. Se seleccionó el plásmido 6 de la construcción 1 (a partir de ahora p16) y el plásmido 1 de la construcción 2 (a partir de ahora p21) para ser digeridos con la enzima de restricción *Xho*I con el fin de verificar que los insertos sean efectivamente las construcciones deseadas. Previamente se procedió a realizar la cuantificación por Nanodrop (Tabla 6). El patrón de restricción esperado para los plásmidos se detalla en la Tabla 7.

Tabla 6 : Datos de concentración obtenidos por nanodrop para los plásmidos p16 y p21.

Plásmido	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
p16	1540	30,81	2,0
p21	848,9	16,97	1,69

Tabla 7: Patrón de restricción esperado luego de la digestión del plásmido Zero\_blunt/pabaA con los insertos deseados (construcción 1 y 2) con XhoI.

p-Zero_blunt/pabaA + C1 (p16)	p-Zero_blunt/pabaA + C2 (p21)
727 pb	727 pb
2210 pb	2210 pb
1332 pb	1560 pb
5726 pb	5726 pb

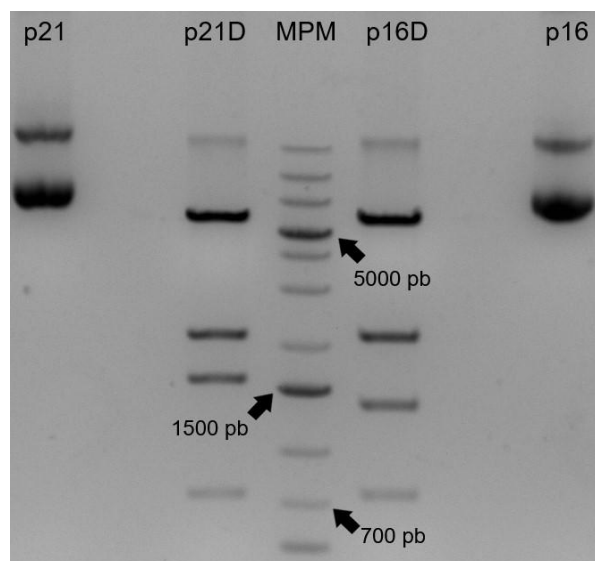


Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis del patrón de digestión de los plásmidos p16 y p21 (3  $\mu$ L). Como control se sembraron los mismos plásmidos sin digerir. En carril central se encuentra el marcador de peso molecular GeneRuler plus 1kb (4  $\mu$ L).

En ambos plásmidos se observó el patrón de restricción esperado (Figura 21 y Tabla 7). Por tanto los plásmidos p16 y p21 contienen las construcciones 1 y 2 respectivamente, junto al marcador *pabaA*.

## 4. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se generaron con éxito las construcciones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF*. Asimismo, éstas se lograron clonar en el plásmido *Zero\_blunt/pabaA*, que contiene el marcador auxotrófico *pabaA*.

En conclusión se lograron todos los objetivos propuestos en el trabajo sin mayor inconveniente. Se obtuvieron plasmidos con las construcciones deseadas que ayudarán a transformar cepas de *A. nidulans* y así poder realizar los ensayos de BiFC y co-inmunoprecipitación necesarios para determinar si existe una interacción directa entre la proteína adaptadora ArtA y el transportador UreA.

Los plásmidos *PalcA::artA-yfp-C::ter-cgrA\_AF/pabaA* y *PalcA::ureA-yfp-N::ter-cgrA\_AF/pabaA* serán utilizados para co-transformar una cepa que porte la delección de los genes *artA* y *ureA*, así como también porte la mutación *pabaA1*. De esta manera se generará la cepa que permite realizar el ensayo de BiFC. Por otra parte, el plásmido *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF/pabaA* se utilizará para transformar una cepa que exprese la fusión UreA-GFP, contenga la delección de *artA* ( $\Delta artA$ ) y porte la mutación *pabaA1* logrando generar la cepa que permite realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación.

## 5. Materiales y métodos.

### 5.1 PCR

#### 5.1.1 Cebadores

Tabla 8: Cebadores utilizados para las reacciones de PCR, junto con sus secuencias (en negrita se marca la secuencia que codifica para el tag HA y los sitios de corte de las enzimas de restricción) y en qué amplificaciones se utilizaron.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Utilización
<i>PalcA-artA</i> -Fw (híbrido)	CCAATCCTATCACCTCGCCTCAAATGCC GGCCGTCTTCTTTCCAG	Amplificación <i>artA</i> (ambas fusiones)
<i>artA-HAx3</i> -Rv (híbrido)	AGCGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTAA GCGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTAAG CGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTATGA CGAATGCGAGTCCGCGGATG	Amplificación <i>artA</i> (construcción 1)
<i>HA-ter-cgrA</i> -Fw (híbrido)	GACGTTCTGACTACGCTTGAACAGCAGA AGAATCTCTCTCC	Amplificación <i>ter-cgrA_AF</i> (construcción 1)
pFW 9.3-Rv	CGAAAGGGCCTCGTGATACG	Amplificación <i>ter-cgrA_AF</i> ambas fusiones
<i>artA-yfp-c</i> -Rv (híbrido)	TTCGGGATCTTGCAGGCCGGGCGTGACG AATGCGAGTCCGCGGATG	Amplificación <i>artA</i> (construcción 2)
<i>yfp-c-linker</i> -Fw (híbrido)	CGCCCGGCCTGCAAGATCCCGAACGACC TGAAACAGAAGGTCATGAACCACATGGCC GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG	Amplificación <i>yfp-c</i>
<i>yfp-c-ter-cgrA</i> -Rv (híbrido)	GGAGAGAGATTCTTCTGCTGTTTACTTGTA CAGCTCGTCCATG	Amplificación <i>yfp-c</i>
<i>ter-cgrA</i> -Fw	ACAGCAGAAGAATCTCTCTCC	Amplificación <i>ter-cgrA_AF</i> (construcción 2)
<b>NotI</b> - <i>PalcA</i> -Fw	AAT <b>GCGGCCG</b> CTAAGTCCCTTCGTATTTCT C	Fusión de fragmentos Contiene sitio de corte de <i>NotI</i>
<b>XbaI</b> - <i>ter-cgrA</i> -Rv	CACT <b>CTAGAG</b> CATGATTCATGACGTATATT CACC	Fusión de fragmentos

		Contiene sitio de corte de <i>Xba</i> I
PalcA-seq	AGGTTCTCAGTCTCACCAAC	Secuenciación
artA-seq1-Fw	TAGGAGCGGTGACCACGACT	Secuenciación
artA-seq2-Fw	TTCTGTCCAAACCGTAACAC	Secuenciación

### 5.1.2 ADN utilizados como molde para las PCR

Para la amplificación del fragmento *yfp-c* se utilizó el plásmido DV8 que contiene dicha secuencia (*Takeshita et al, 2008*). Mientras que, para los fragmentos *ter-cgrA\_AF* se requirió del plásmido FW9.3 (*Wanka et al, 2016*). Finalmente, para la amplificación del gen *artA* se utilizó una cepa de *A. nidulans* presente en el cepario del laboratorio, llamada MVD 10A. Esta cepa tiene la característica de ser *ureA::gfp::pyrGAf riboB2 pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::argB* y, por tanto, salvaje para *artA*.

### 5.1.3 Fusion-PCR

#### 5.1.3.1: Primera ronda

Con el fin de amplificar los fragmentos de ADN de las secuencias *artA*, *yfp-c*, y *ter-cgrA\_AF* se realizaron ensayos de PCR. Se utilizó el kit KAPA HiFi PCR (Roche), con polimerasa de alta fidelidad, recomendado para reacciones de PCR. Es decir, no utiliza Taq ADN polimerasa sino que contiene una polimerasa con una tasa de error 100 veces menor, 1 error cada  $3,6 \times 10^6$  nucleótidos incorporados. Además cabe destacar que los fragmentos generados con el kit KAPA HiFi PCR poseen extremos romos.

Los programas de amplificación utilizados se detallan a continuación:

*Tabla 9: Programa de amplificación para fragmentos artA, yfp-c y ter-cgrA\_AF, en negrita se marcan las etapas del ciclado, se utilizaron 25 ciclos.*

Para <i>ter-cgrA_AF</i> e <i>yfp-c</i>	3 minutos 95 °C	<b>20 segundos</b> 98°C	<b>15 segundos</b> 61°C	2 minutos 72°C	5 minutos 72°C	Mantener a 20°C
Para <i>artA</i>	3 minutos 95°C	<b>20 seg</b> 98°C	<b>2 minutos</b> 61°C	<b>2 minutos</b> 72°C	5 minutos 72°C	Mantener a 20°C

Tabla 10: Mezcla de las reacciones de amplificación

Fragmento	<i>artA</i> (C1)	<i>yfp-c</i>	<i>ter-cgrA_AF</i> (C1)	<i>artA</i> (C2)	<i>ter-cgrA_AF</i> (C2)
Cebadores Fw/Rv	0,75 $\mu$ L c/u	0,75 $\mu$ L c/u	0,75 $\mu$ L c/u	0,75 $\mu$ L c/u	0,75 $\mu$ L c/u
Buffer	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
dNTPs	0,75 $\mu$ L	0,75 $\mu$ L	0,75 $\mu$ L	0,75 $\mu$ L	0,75 $\mu$ L
ADN polimerasa	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
ADN molde	3 $\mu$ L cepa MVD 10A	0,5 $\mu$ L pDV 8	1 $\mu$ L pFW 9.3	3 $\mu$ L cepa MVD 10A	1 $\mu$ L pFW 9.3
Agua mQ	14,25 $\mu$ L	16,75 $\mu$ L	16,25 $\mu$ L	14,25 $\mu$ L	16,25 $\mu$ L
Tamaño esperado	1671 pb	333 pb	328 pb	1610 pb	307 pb

### 5.1.3.2 Segunda ronda de amplificación

Para la fusión de los fragmentos amplificados (*PalcA*, *artA*, *yfp-c* y *ter-cgrA\_AF*) se realizó una PCR utilizando el kit KAPA HiFi PCR. Los cebadores fueron NotI-PalcA-Fw y XbaI-ter-cgrA-Rv para las dos fusiones, conteniendo cada uno sitios de corte para *NotI* y *XbaI* respectivamente. Siguiendo las instrucciones del kit, se colocó 1  $\mu$ L de cada cebador, 0,5  $\mu$ L de la enzima “KAPA HiFi DNA polimerase”, 5  $\mu$ L de KAPA HiFi buffer y 0,75  $\mu$ L de dNTPs. Para la primera fusión (construcción 1), además, se agregó 25 ng de cada fragmento; *palcA*, *artA* (C1) y *ter-cgrA\_AF* (C1). Mientras que para la segunda (construcción 2) se colocó 25 ng de *palcA*, *artA* (C2), *yfp-c* y *ter-cgrA\_AF* (C2). Finalmente en ambos casos se llevó a 25  $\mu$ L con agua mQ.



Tabla 11: Mezcla para las fusiones por PCR

Fragmento	Fusión 1	Fusión 2
Cebadores Fw/Rv	1,00 $\mu\text{L}$ c/u	1,00 $\mu\text{L}$ c/u
Buffer	5,00 $\mu\text{L}$	5,00 $\mu\text{L}$
dNTPs	0,75 $\mu\text{L}$	0,75 $\mu\text{L}$
ADN polimerasa	0,50 $\mu\text{L}$	0,50 $\mu\text{L}$
ter-cgrA_AF (C1)	2,03 $\mu\text{L}$	-
ter-cgrA_AF (C2)	-	0,53 $\mu\text{L}$
artA (C1)	2,52 $\mu\text{L}$	-
artA (C2)	-	1,50 $\mu\text{L}$
yfp-c	-	2,01 $\mu\text{L}$
PalcA	0,72 $\mu\text{L}$	0,72 $\mu\text{L}$
Agua mQ	11,48 $\mu\text{L}$	11,99 $\mu\text{L}$
Tamaño esperado	2351 pb	2633 pb

#### 5.1.4 PCR de colonia

Con el fin de corroborar que las colonias de *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes fueron efectivamente transformadas con el plásmido *Zero\_blunt/pabaA* conteniendo las construcciones, se procedió a realizar PCR en colonia. La reacción se hizo con una Taq polimerasa estándar ya que solo queremos corroborar que el plásmido posea las construcciones de interés. Para llevar a cabo la PCR colonia, se picaron las colonias y se resuspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril. De esa suspensión se tomó 1  $\mu\text{L}$  como molde para la PCR. Los cebadores utilizados fueron artA-seq1-Fw y XbaI-ter-cgrA-Rv.

Tabla 12: Programa de amplificación para la PCR en colonia de las construcciones en pZero\_blunt/pabaA. En negrita se muestran las etapas de ciclado (se realizaron 34 ciclos).

2 minutos 94°C	10 seg 94°C	20 seg 60°C	1,5 minutos 72°C	5 minutos 72°C	Mantener a 20°C
-------------------	----------------	----------------	---------------------	-------------------	--------------------

Tabla 13: Mezcla de las reacciones de amplificación de construcción C1 y C2 plásmido pZero\_blunt/pabaA.

Fragmento	pZ blunt/pabaA +C1	pZ blunt/pabaA +C2
Cebadores Fw/Rv	0,75 $\mu$ L c/u	0,75 $\mu$ L c/u
Buffer	2,50 $\mu$ L	2,50 $\mu$ L
dNTPs	0,50 $\mu$ L	0,50 $\mu$ L
ADN polimerasa	0,25 $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
Molde	1,00 $\mu$ L	1,00 $\mu$ L
Agua mQ	19,25 $\mu$ L	19,25 $\mu$ L
Tamaño esperado	1382 pb	1610 pb

## 5.2 Electroforesis en gel de agarosa

Los distintos ADNs (productos de PCR y ADN plasmídico) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa a distinta concentración, dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN. Los geles se corrieron en buffer TAE (1x) y dependiendo del tamaño esperado del ADN a analizar se utilizaron dos marcadores moleculares distintos. Uno de ellos fue Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA (Figura 22) y el otro fue Thermo GeneRuler 100 pb DNA (Figura 23) para secuencias más pequeñas. El agente intercalante utilizado fue Sybr Safe (Thermo). Siguiendo el protocolo, los geles se corrieron a 8 V por cm del gel (entre 75 V y 120 V) durante 40-120 minutos. Luego se observó los resultados utilizando luz UV.

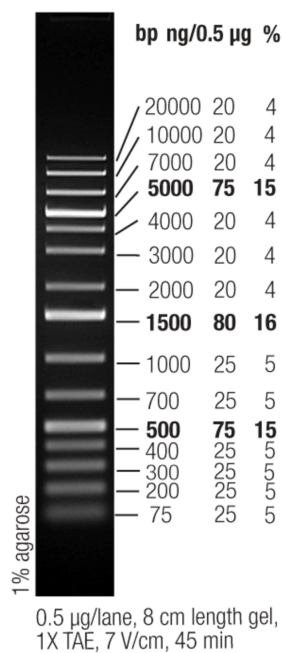


Figura 22: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb plus.

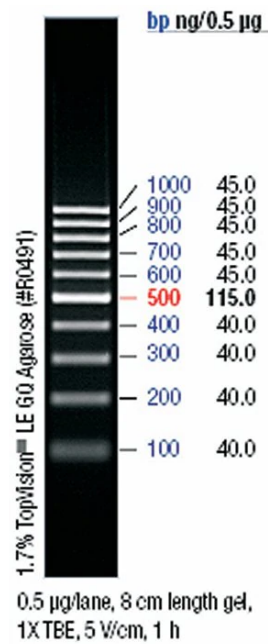


Figura 23: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb

## Soluciones empleadas

**Buffer TAE:** Tris base 54 g, ácido bórico 27,5 g, 0.5 M EDTA pH 8, 20 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada. El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente.

**Buffer de carga:** 0,25% xilencianol, 0,25% azul de bromofenol y 30% de glicerol, en agua. Se almacena a 4°C o a temperatura ambiente.

## 5.3 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Tanto para la purificación directa, como la extracción y purificación de las bandas de ADN contenidas en los geles de agarosa, se empleó el kit de purificación “GeneJet Gel Extraction Kit” de la empresa Thermo Scientific™. Para ello se cortaron las bandas del gel de agarosa, se pesaron y colocaron en tubos de 2 mL.

Posteriormente se agrega 400  $\mu$ L de buffer disolvedor por cada 0,1 g de gel. Se incuba a 55°C por 15 minutos, vortexeando cada 3 minutos. Luego de los 15 minutos o cuando no se observe gel en los tubos, el contenido pasa a través de una columna centrifugando por 2 minutos y se descarta el líquido sobrante. Para limpiar de contaminantes el ADN, se agrega solución de lavado a la columna y se centrifuga por 2 minutos. Finalmente la columna se coloca en otro tubo y se eluye la muestra de ADN con buffer de elusión o H<sub>2</sub>O mQ, centrifugando nuevamente por dos minutos. Una vez purificadas las bandas del gel de agarosa, se utiliza el NanoDrop para cuantificar la concentración de la muestra obtenida.

## 5.4 Vectores utilizados para clonado y subclonado

Tabla 14: Vectores utilizados en el trabajo

Vector	Característica	Utilización
pJET 1.2 blunt cloning (Thermo)	Resistencia a ampicilina	Clonado para secuenciación
Zero_blunt/ <i>pabaA</i> (generado previamente en el laboratorio)	Resistencia a kanamicina Portador del marcador auxotrófico <i>pabaA</i>	Sub-clonado de las construcciones

### 5.4.1 pJet 1.2

El plásmido de clonado pJET1.2/*blunt* (Figura 24) es un plásmido lineal que posee la característica de permitir la ligación de fragmentos de ADN con extremos romos. El vector de clonación pJET1.2/*blunt* lleva para su selección resistencia a ampicilina y un gen de enzima de restricción letal (*eco47IR*) que se interrumpe mediante la unión de un inserto de ADN en el sitio de clonado. Como resultado, sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Si el vector vuelve a circularizar sin un inserto, expresa la enzima de restricción letal que mata la célula de *E.coli* huésped después de la transformación. Esta selección positiva acelera drásticamente el proceso de selección de colonias y elimina los costos adicionales necesarios para otros tipos de selección. Por conveniencia en el mapeo y manipulación del inserto, el sitio de clonación múltiple del vector pJET

1.2/blunt contiene dos secuencias de reconocimiento de *BgIII* que flanquean el sitio de inserción. Además, el vector contiene un promotor T7 para la transcripción *in vitro* e *in vivo*, así como para la secuenciación del inserto (mediante el uso de primers universales T7 y SP6). Los productos de PCR de extremos romos generados mediante ADN polimerasas, se pueden ligar directamente al vector en solo 5 minutos aunque en nuestro caso se incubó 30 minutos.

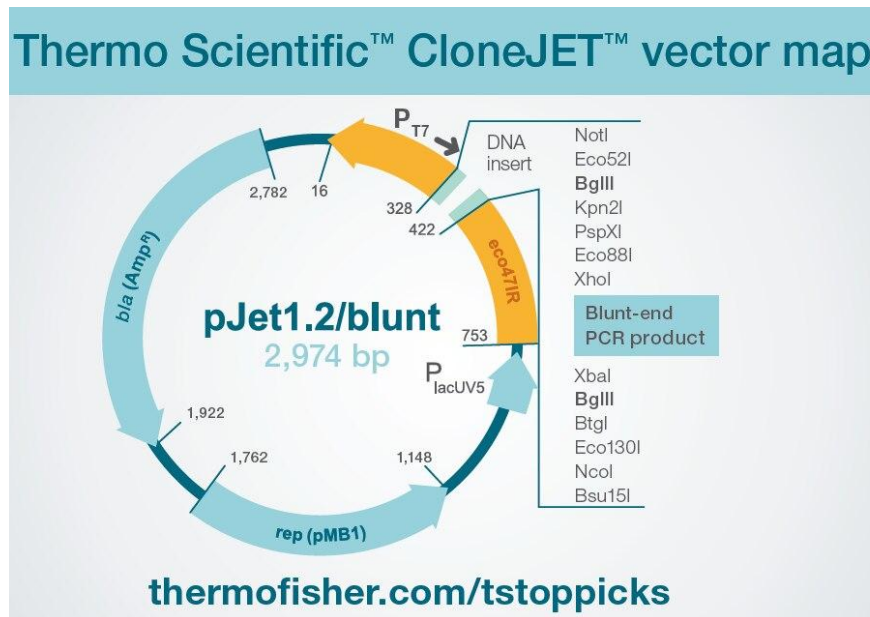


Figura 24: Esquema del plásmido pJet1.2/blunt utilizado para clonar las dos construcciones.

#### 5.4.2 pZero\_blunt/pabaA

Este plásmido (Figura 25) se utilizó para subclonar las fusiones *PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF* y *PalcA::artA-yfp-c::ter-cgrA\_AF* con extremos cohesivos. Previamente en el laboratorio se clonó en el mismo, el gen *pabaA* de *A. nidulans* (complementa la mutación *pabaA1*) por clonado *blunt*. Además, este plásmido permite la selección por dos antibióticos de las células transformadas gracias a que posee genes de resistencia a kanamicina y zeocina.

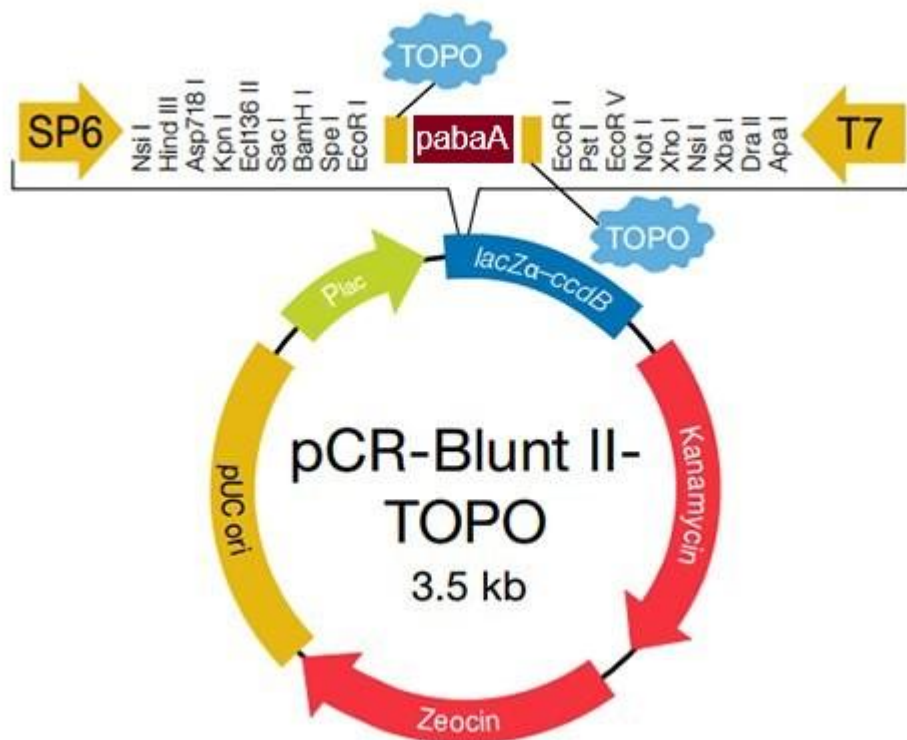


Figura 25: Representación esquemática del plásmido pCR-Blunt II TOPO. Este mapa muestra también los sitios de restricción, en particular los sitios de escisión *NotI* y *XbaI* que se usaron para digerir el plásmido y las fusiones.

## 5.5 Clonado

### 5.5.1 Ligación

#### Ligación de construcciones en plásmido pJet

Se utilizó el ClonJet PCR Cloning kit (ThermoCat. No. K1231) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocó 5  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción (2x), 0,5  $\mu\text{L}$  del vector pJET1.2/*blunt*, 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 ADN ligasa, 75 ng de las fusiones purificadas obtenidas previamente por PCR y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta los 10  $\mu\text{L}$ . Los 75 ng de las fusiones correspondieron a 1  $\mu\text{L}$  de la fusión 1 y 1,6  $\mu\text{L}$  para la fusión 2. Se debe tener en cuenta que para esta ligación se utilizó una relación de 3:1 entre las fusiones y el plásmido como se recomienda en el kit. Posteriormente se incubó la mezcla a 22°C por 30 minutos.

### Ligación con T4 DNA ligase (New England Biolabs, M0202S)

Para la ligación se mezcló 1,4  $\mu\text{L}$  de vector Zero\_blunt/*pabaA* (50 ng, previamente digerido con *NotI* y *XbaI*), 1  $\mu\text{L}$  de ligasa de ADN T4, 2  $\mu\text{L}$  de Buffer de ligasa de ADN T4 y  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas hasta un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . Además se agregó las construcciones obtenidas luego de digerir los plásmidos 1D y 2D con *NotI* y *XbaI* en una relación molar 5:1 (fusión:vector). En concreto, se utilizó 78,48 ng de la construcción 1 que corresponden con 3,7  $\mu\text{L}$  y 87,52 ng de la construcción 2 que corresponden con 3,4  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se incubó toda la noche a 16 °C. Luego para inactivar la ligasa se colocó a 65°C por 10 minutos.

### 5.5.2 Transformación de *E.coli* por shock térmico

Se agregan no más de 50 ng de plásmido (en un volumen menor al 10% del volumen de células) a células quimiocompetentes de *E. coli DH5 $\alpha$* . En nuestro caso, se utilizó directamente la mezcla de ligación (construcciones uno y dos con plásmido pJet) con un volumen de 5  $\mu\text{L}$  en 50  $\mu\text{L}$  de células. Luego se deja la mezcla durante 30 minutos en hielo y se procede a incubar por 90 segundos a 42°C (o 120 segundos a 37°C). Inmediatamente después se pasa al hielo y se incuba 2 minutos. Posteriormente se agregan 4 volúmenes de medio LB (200  $\mu\text{L}$ ) y se deja 1 hora a 37°C con agitación (200 r.p.m) continua. Finalmente se plaquea 100  $\mu\text{L}$  en medio LB sólido con antibiótico. Al resto celular se le da un spin, descarta cierto volumen de sobrenadante de manera que quede un poco para resuspender las células, y se resuspende para plaquear todo en medio LB + antibiótico. Incubar 16-24 hs en estufa a 37°C.

Medio LB :

5 g extracto de levadura

10 g triptona

10 g NaCl

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta a pH 7 y se esteriliza. Ya que el medio puede utilizarse líquido o sólido, para este último se agrega 1,5 % agar. Cuando se necesitó kanamicina se colocó a una concentración de  $30 \mu\text{g/mL}$  y cuando se requirió de ampicilina fue de  $50 \mu\text{g/mL}$ .

#### 5.5.2.1 Preparación de células quimiocompetentes

Se propagó la cepa de interés, DH5 $\alpha$ , en placa con medio LB sólido de agar, dejando crecer *overnight* a 37°C. Se picó una colonia y se inoculó en 3 mL de LB estéril y se dejó crecer *overnight* a 37°C con agitación (200 r.p.m). La preparación de las células competentes se inició inoculando un matraz con 250 mL de LB estéril con 2,5 mL del precultivo (dilución 1/100). A continuación, se incubaron las células a 37°C con agitación constante a 200 r.p.m hasta llegar a una densidad óptica de 0.300 a 600 nm. Fue importante, para obtener éxito en la preparación, trabajar desde este punto hasta el final con materiales previamente enfriados a 4°C. De esta forma, el cultivo crecido fue traspasado a un tubo de centrifuga previamente enfriado y se centrifugó a 5.000 r.p.m por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el "pellet" celular fue lavado con 100 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril 0.1 M en hielo en dos pasos: primero, se agrega 20 mL agitando suavemente hasta que las células están bien dispersas y segundo, llevar hasta los 100 mL. Luego, se centrifugó nuevamente a 5.000 r.p.m por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el "pellet" fue resuspendido con 100 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril 0.1 M en hielo. Se incubó 30 minutos a 4° y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se resuspendió el "pellet" en 3 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M con 20% de glicerol y se alícuota de a 50  $\mu\text{L}$  en eppendorfs previamente enfriados. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se evaluó la eficiencia de transformación (unidades formadoras de colonias por microgramo de ADN) utilizando un vector de concentración conocido.



### 5.5.3 Transformación de *E.coli* por electroporación

Para esta transformación por electroporación el primer paso fue descongelar en hielo 50  $\mu\text{L}$  células electrocompetentes *E.coli* DH5 $\alpha$ . Las células fueron facilitadas por otro laboratorio de modo que no fue necesario prepararlas. Luego se colocó 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de ligación, se homogeneizó y se dejó por 2 minutos en hielo. Posteriormente se pasó a una celda de electroporación fría y se le dió un pulso de entre 1,8 y 2,5 Kvolt por 5 segundos. Para recuperar las células se agregó 1 mL de LB por dos horas a 37 °C con agitación 200 r.p.m. Finalmente se plaquea 100  $\mu\text{L}$  en medio LB sólido, al resto celular se le dió un spin descartando cierto volumen de sobrenadante de manera que quede un poco para resuspender las células, y se resuspendió para plaquear todo en medio LB con kanamicina. Se incubó a 16-24 hs en estufa a 37°C.

## 5.6 Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Para extraer plásmidos primero se debe seleccionar una colonia aislada y luego picarla para incubar en 3 mL de medio LB + antibiótico. Para conservar el clon, también se debe repicar esa misma colonia en una placa con medio LB sólido + antibiótico. Se deja crecer a 37°C por 16-24 horas. Al otro día se traspasa el volumen a tubo eppendorf, se centrifuga por 30 segundos y se elimina el sobrenadante (repetir hasta terminar los 3 mL). Después se resuspendió con pipeta en 200  $\mu\text{L}$  de Solución I, se agregó 5  $\mu\text{L}$  de ARNasa 10 mg/mL y se incubó a 37°C por 5 minutos. Posteriormente se agrega 200  $\mu\text{L}$  de Solución II recién preparada y se mezcla despacio por inversión sin llegar a dejarla mucho tiempo con esta solución. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de Solución III fría, mezclar bien por inversión y dejar 5 minutos en hielo. Pasados estos 5 minutos se agrega 200  $\mu\text{L}$  de Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se vortexea bien. Luego se centrifuga 15 minutos a 12000 g y se toma el sobrenadante (aproximadamente 400-500  $\mu\text{L}$ ). Se precipita con 1 volumen de Isopropanol (mezclando por inversión) y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 15 minutos a 12000 g y descartar el sobrenadante. Lavar con 500  $\mu\text{L}$  de Etanol 70% invirtiendo varias veces, centrifugar por 5 minutos a 12000 g y removemos el sobrenadante. Por último se deja secar al aire o podemos agilizarse

este paso dejando secar bajo una lamparita por no más de 10 minutos. Se resuspende en 50  $\mu$ L de TE 10-1 pH 8 y se almacena a -20 °C.

#### Soluciones utilizadas:

Solución I: 50 mM Tris. HCl pH 7.5; 20 mM EDTA pH 8.

Solución II: 0,2 N NaOH; 1% SDS. Se prepara en el momento.

Solución III: 3 M AcK; 11,5% ácido acético glacial. Esta solución debe estar fría por lo que se recomienda preparar 50 mL (14,7 g de AcK + 5,75 mL AcH glacial, llevar a 50 mL con H<sub>2</sub>O mQ) y guardar en la heladera.

## 5.7 Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron utilizando 1 unidad enzimática de la enzima correspondiente por  $\mu$ g de ADN, 1x buffer correspondiente y H<sub>2</sub>O mQ esteril. Se incubó durante 1 hrs a 37°C en el caso de las enzimas *NotI* y *XbaI* (FastDigest, Thermo) y se dejó toda la noche a la misma temperatura para el caso de *XhoI* (Invitrogen).

## 6. Bibliografía

- Abreu, C et al, 2010. UreA, the major urea/H<sup>+</sup> symporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. 47:1023.1033.
- André, B. y Haguenaer-Tsapis,R. 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. Top.Curr.Genet. 9: 273-323.
- Alvarez,C.E. et al, 2008. On the origins of arrestin and rhodopsin. BMC Evol Biol 8:222.
- Amillis,S. et al, 2004. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. Mol. Microbiol. 52, 205-216.
- Amillis, S. et al, 2007. Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. Mol Membr Biol. 24(3): 206–214.
- Apostolaki, S. et al, 2009. AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. Eukaryot. Cell. 9, 339-352.
- Arst,H.N. et al, 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 126,11-141.
- Bailey, C. et al, 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Eur. J. Biochem. 51, 573-577.
- Barata-Antunes, C. et al, 2021. Endocytosis of nutrient transporters in fungi: The ART of connecting signaling and trafficking.Comput Struct Biotechnol J. 19: 1713–1737.
- Becuwe, M. et al, 2012. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. J Cell Biol. 23:247-259.
- Belgareh-Touzé, N. et al, 2008. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. Biochem. Soc. Transac. 36 , 791–796.
- Berger, H. et al, 2006. The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. Mol. Microbiol. 59, 433–446.

- Boyd, J. et al, 2003. Trans-inhibition and voltage-gating in a fungal nitrate transporter. *J Membr Biol.* 195(2): 109–120.
- Brambl, R. et al, 2004. *The Mycota. A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research.*
- Caddick, M. 1992. Characterization of a major *Aspergillus* regulatory gene, *areA*. En U.S. Tudzynski, *Molecular Biology of Filamentous Fungi.* 141-152.
- Cecchetto, G. et al, 2004. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J.Biol.Chem.* 279, 3132-3141.
- Chu, X.L. et al, 2015. Qualitative ubiquitome unveils the potential significance of protein lysine ubiquitination in hyphal growth of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 62 (1): 191-201.
- Creaser, E.H. et al, 1985. Purification and preliminary characterization of alcohol dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 225, 449-454.
- Cubero, B. et al, 2000. Metabolite repression and inducer exclusion in the proline utilization gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* 182(1): 233–235.
- Cubero. B. and Scazzocchio, C. 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 15;13(2): 407–415.
- Cultrone, A. et al, 2007. The tightly regulated promoter of the *xanA* gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron. *Mol. Microbiol.* 63, 1577–1587.
- Dalbey, R.E. and Chen, M. 2004. Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1694(1–3): 37–53.
- Davis, M.A. et al, 1993. Fungal catabolic gene regulation: Molecular genetic analysis of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetica.* 90(2–3): 133–145.
- Darlington, A.J. et al, 1965. Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. *Nature* 206, 599-600.
- Diallinas, G. et al, 1995. Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J Biol Chem.* 270(15): 8610–8622.
- Diallinas, G. (2007). *Aspergillus* Transporters. *Aspergilli, Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods.* G. H. Goldman and S. A. Osmani, CRC Press: 301-320.

- Diallinas, G (2016). Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. Trends Genet.
- Dominguez, M. et al, 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi net-work bind both COP I and II coatomer. J Cell Biol. 140, 751–765.
- Dupré, S. et al, 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. Biochim Biophys Acta 169: 89-111.
- ElBerry, H.M. et al, 1993. Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriol. 175, 4688-4698
- Elliott, C.G. 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. Genet.Res.Camb. 1, 462-476.
- Fromme, J.C. and Schekman, R. 2005. COPII-coated vesicles: Flexible enough for large cargo? Curr Opin Cell Biol. 17(4): 345–352.
- Galagan, J.E. et al, 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A.fumigatus* and *A.oryzae*. Nature 438:1105-1115.
- Gilbert, P.M. et al, 2006. Escalating worldwide use of urea - a global change contributing to coastal eutrophication. Biochemistry 77, 441-463.
- Glatigny, A. and Scazzocchio, C. 1995. Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem.270(8):3534–3550.
- Gonzalez, R. et al, 1997. The integration of nitrogen and carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* requires the GATA factor AreA and an additional positive-acting element, ADA. EMBO J.16(10): 2937–2944.
- Gorfinkiel, L. et al, 1993. Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem. 268(31):23376–23381.
- Gournas, C. et al, 2010. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric-xanthine permease. Mol.Microbiol. 75, 246-260.
- Haguenauer-Tsapis, R. et al, 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. Topics in Current Genetics 9, pp.273-323.
- Hattema, E.H. et al, 2004. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. EMBO J 23:1279-1288.
- Herrador, A. et al, 2010. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein.

*Mol. Cell. Biol.* 30, 897-907.

-Hsien-Tsung, L. and Cheng-Ming, C. 2013. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) Assay for Direct Visualization of protein-protein interaction in vivo. *Bio Protoc.* 3(20).

-Hu, C.D. et al, 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*; 9: 789-98.

-Huang,Y. et al, 2009. Complementation and Reconstitution of Fluorescence from Circularly Permuted and Truncated Green Fluorescent Protein.

-Karachaliou, M. et al, 2013. The arrestin-like protein ArtA is essential for ubiquitination and endocytosis of the UapA transporter in response to both broad-range and specific signals. *Mol Microbiol* 88(2): 301-317.

-Kee, Y. et al, 2006. The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5- dependent Lys63-linked poly ubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 36724-36731.

-Kerscher,O. et al, 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Rev.Cell.Dev.Biol.* 22 159-180

-Klingenberg, M. 2007. Transport viewed as a catalytic process. *Biochimie* 89, 1042-1048.

-Kodama, Y. and Hu, C.D. 2012. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 53, 285–298.

-Kodama,Y and Hu, C.D 2013. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis of Protein–Protein Interaction: How to Calculate Signal-to-Noise Ratio.

-Koukaki, M. et al, 2005. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J.Mol. Biol.* 350, 499-513.

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

-Lefkowitz R. J. et al, 2006. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517 .

-León, S. et al, 2009. Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 19: 2379-2388.

- Léon, S. et al, 2009. Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp cell Res* 315: 1574-1583.
- Lin, C.H. et al, 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.
- Liu L.H. et al, 2003. AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H<sup>+</sup> symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 790-800.
- Ma, L. and Pei, G. 2007. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J. Cell Sci.* 120, 213-218.
- MacCabe, A.P. et al, 2001. *Aspergillus nidulans* as a model organism for the study of the expression of genes encoding enzymes of relevance in the food industry. *Applied Mycology and Biotechnology*. Vol 1.
- MacGurn, J.A. et al, 2011. TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* 147: 1104-1117.
- Meacock, S.L. et al, 2000. Protein targeting and translocation at the endoplasmic reticulum membrane through the eye of a needle? *Essays Biochem.*36: 1–13.
- Merigout P. et al, 2008. Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 147, 1225-1238.
- Meusser, B. et al, 2005. ERAD: The long road to destruction. *Nat Cell Biol.*7(8): 766–772.
- Meyer, V. et al, 2011. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism independent expression system for *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* 77,2975-83.
- Mirza, O. et al, 2006. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H<sup>+</sup> symport in LacY. *EMBO J.* 25, 1177-1183.
- Mittal, R. et al, 2009. Arrestin as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting. *EMBO Rep.* 2009. 10: 41-43.
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 580-585.
- Morel, M. et al, 2008. Characterization and regulation of PiDur3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 912-921.
- Navarathna, D.H. et al, 2011. Dur3 is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase Dur1,2. *Microbiology* 157, 270-279.

- Nikko, E. et al, 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO J.* 9: 1216-1221.
- Nishimura, N. and Balch, W.E. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science.* 277, 556–558.
- O'Donnell, A. F. et al, 2010. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3552-3566.
- Oestreicher, N. and Scazzocchio, C. 1993. Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 268(31): 23382–23389.
- Osmani, S.A et al, 1988. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell* 52, 241-251.
- Osmani, S.A et al, 2004. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 401-410.
- Palmer, L.M. et al, 1975. Pyrimidine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. Isolation and characterisation of mutants resistant to fluoropyrimidines. *Mol.Gen.Genet.* 140(2): 165–173.
- Pateman, J.A et al, 1982. Urea and thiourea transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Gnet.* 20, 777-790.
- Peng, J. et al, 2003. A proteomic approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21. 921-926.
- Pantazopoulou, A. et al, 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet.Biol.* 44, 627-640.
- Perry, A.J. and Lithgow, T. 2005. Protein targeting: Entropy, energetics and modular machines. *Curr Biol.* 15(11): R423–425.
- Pontecorvo, G. et al, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5: 141-238.
- Punt, P.J. et al, 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. *Mol Cell Biol.* 15(10): 5688–5699.
- Reggiori, F y Pelham, H.R.B. 2002. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol.* 4: 117-123.



- Reider, A. et al, 2011. Endocytic adaptors- social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2011. 124: 1613:-1622.
- Ren, Q. et al, 2007. TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res.* 35, D274–D279.
- Rotin, D et al, 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.*10(6):398-409.
- Sanguinetti, M. et al, 2014. Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H<sup>+</sup> transporters in fungi and plants. *Open Biol.* 4, 140070.
- Scazzocchio, C. et al, 1968. The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochem.Biophys.Acta* 166, 557-568.
- Scazzocchio, C. 1992. Control of gene expression in the catabolic pathways of *Aspergillus nidulans*: A personal and biased account. *Biotechnology.* 23: 43–68.
- Scazzocchio, C. et al, 2019. *Aspergillus*: A multifaceted genus.
- Shyu, Y. and Hu, C.D. 2008. Fluorescence complementation: An emerging tool for biological research. *Trends in Biotechnology,* 26, 622–630.
- Smith, A.L. et al, 2011. ReCLIP (reversible cross-link immuno-precipitation): an efficient method for interrogation of labile protein complex, *PLoS ONE* 6 (2011) e16206.
- Sophianopoulou, V. et al, 1998. The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*.*Mol Microbiol.* 3(6):705-14.
- Sophianopoulou, V. et al, 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 33(2):115–125.
- Stimpsons, H.E. et al, 2006. Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J* 25. 662-672.
- Szewczyk, E. et al, 2007. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols.* 1(6): 3111-3120.
- Takeshita, N. et al, 2008. Apical Sterol-rich Membranes Are Essential for Localizing Cell End Markers That Determine Growth Directionality in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*.*Mol.Biol.Cell.* Vol. 19, 339–351.

- Tavoularis, S. et al, 2001. Functional Expression and Cellular Localization of a Green Fluorescent Protein-Tagged Proline Transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 33(2): 115-125.
- Tavoularis, S. et al, 2003. Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Membr.Biol.* 20(4):285-97.
- Tazebay, U.H. et al, 1997. The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is upregulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol Microbiol.*24(1): 105–117.
- Todd, R.B et al, 2007. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction.
- Valdez-Taubas, J. et al, 2004. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal GenetBiol.* 41:42-51.
- Vianti et al, 2008. The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol. Microbiol.* 68:959–977.
- Wadiche, J.I. and Kavanaugh, M.P. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/ chloride channel. *J Neurosci.* 18(19): 7650–7661
- Wang, W.H. et al, 2012. Rice Dur3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 193, 432-444.
- Wang, G. et al, 1999. Functional domains of the Rsp5 Ubiquitin-Protein Ligase. *Mol.Cell.Biol* 19, 342-352.
- Wanka, F. et al, 2016. Tet-on, or Tet-off, that is the question: Advanced conditional gene expression in *Aspergillus*. *Fungal Genet. Biol.* 89, 72-83.
- Warring, B.R. et al, 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene.* 79, 119-130.
- Wiame, J.M. et al, 1985. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol.* 26: 1–88.
- Wilson, R.A. et al, 1998. Mutational analysis of AreA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the “streetwise” GATA family of transcription factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3): 586–596.
- Xin-ling chu et al, 2015. Qualitative ubiquitome unveils the potential significance of protein lysine ubiquitination in hyphal growth of *Aspergillus nidulans*.*Curr Genet.*

- Yang, L. et al, 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of green fluorescent protein-tagged centromeric markers in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell 3, 1359-1362.
- Zanin, L. et al, 2014. Isolation and functional characterization of a high affinity urea transporter from roots of *Zea mays*. BMC Plant Biol 14:222.
- Zamudio-Arroyo, J.M. et al, 2012. Ubiquitination: An organismal dynamic regulatory system. TIP vol.15 no.2.

## 7. Anexo

### Secuencia promotor PalcA

En azul secuencia upstream

Con fondo amarillo los cebadores:

PalcA-Fw 5'-ACCTAAGACACTTTGACACG-3'

PalcA-Rv 5'-TTTGAGGCGAGGTGATAGGA-3' (TCCTATCACCTCGCCTCAA)

PalcA-seq-Fw 5'-AAGGTTCTCAGTCTCACCAAC-3'

ACCTAAGACACTTTGACACG**GCCGGAACACTG**TAAGTCCCTTCGTATTTCTCCGCCTGTGTGGAGCTACCATCCAAT  
AACCCCCAGCTGAAAAGCTGATTGTGATAGTTCCTACTTGTCCGTCCGCATCCGCAGCTCGGGATAGTTC  
GACCTAGGATTGGATGCATGCGGAACCGCACGAGGGCGGGCGGAAATTGACACACCACTCCTCTCCACGCACCGTT  
CAAGAGGTACCGTATAGAGCCGTATAGAGCAGAGACGGAGCACTTTCTGGTACTGTCCGCACGGGATGTCCGCACG  
GAGAGCCACAAACGAGCGGGGCCCGTACGTGCTCTCTACCCAGGATCGCATCCCCGCATAGCTGAACATCTATA  
TAAAGACCCCC**AAGGTTCTCAGTCTCACCAAC**CATCATCAACCAACAATCAACAGTTCTCTACTCAGTTAATTAGAAC  
TCTTCCAA**TCCTATCACCTCGCCTCAA**

### Secuencia *artA*

Con fondo amarillo los cebadores:

artA-seq1-Fw 5'-TAGGAGCGGTGACCACGACT-3'

artA-seq2-Fw 5'TTCTGTCCAAACCGTAACAC-3'

**ATG**CCCGGCCGTCTTCTTTCCAGCCTAGTTCGCCCTCCCTTTCTCACCCTCGATCTTCCCTCACTCCAACCTCTTC  
TTCGTCTCGTCTGTAAACGAAGTCTCCAGCCGCATCTTCCAAGCACTCGCACACTGACAGATCACATTCGCCGG  
AGCGCCGTCTATCCTTCTCAATGGACCACTTTATCCACACTTACCGGGACCATCACAATAAGGAAAAGCATCGAAAG  
CACGGACGTTCTCTCGTTCAAAGGAGCGTGGCAGCCATGAGGAAACGGCAGCTTCAGCTAAACTTGATGTCATCGT  
GGAATCTCCACCTCTTGTGTTGCTATGGAACACCGCGAACTCTACGGGTGCTTTGTTCTCTGGCCGCCTCAGAATTA  
CCGTACCCGAAGCAACGGCATGGTCATCTTGACAAGTTCGATATGCGCTTGATGATTAGAAAGACGACGAAGAAG  
CCCGTCTCGAGGGACTGCCCAATTGCGCCTCCAAGACCGAGGAACTGACAACTGGAACCTCCTGACGGAACCTCT  
CCACCT**TAGGAGCGGTGACCACGACT**TCCCTTTCAGTTATCTGTTCCAGGTAACCTGCCGGCGTCGTGTAATGGTT  
CCCTGGGACAGATTGAATATTTCTTCAAGCACACGGACACAATGTGAACGGTGAAGAGTACAATTTTAGAATGCCG  
CTACACATGCGCCGCGCCATTTCTCCAGGGAACGACAAAATCCTCAATTCGTATCTTTCCACCCACCAATCTAACTGG  
CCGCATCGTCTCCATCTGTTGTCCACCCAATTGGGACTTTTCCCGTTCAGATGACCTTGAGCGGTGTCTTGATA  
AAGGCGAGGAGACCCAAACGCGTTGGCGGTACGCAAGATGATGTGGCGGATTGAAGAGCACCAGAAGATTGTCTCA  
ACCGCTTGCCCAAGCACGCGCACAAGATTGGTGGCGAAGGAAAGGGCTTCTGCACCAGGAGACGGGATCATGG  
ACACAACGAGGAGAAAGATGGCTGGAAGACAGACTTTGATACCGCTGGAGGCGAGATAAGCATGGAATTTGAAGCCA  
ACATTAACCCAACCGCCAACCGGTGTGTGATCTTGAGGACCGGGTGGACTGGAGACGAAGCACAATTTGGTCATT  
GAACTGATTGTTGCGGAGGAA**TTCTGTCCAAACCGTAACAC**CAGACTCATCACTCCAACAGGAGCTGCCCGGTCTCT  
TCGCATGCAGTTTAACTGCACGTTACGGAGAGAAGCGGGCTCGGTATCAGCTGGGATGAGGAGATGCCGCCAGTAT

ACGAAGACGTTCCCGCTAGCCCTCCCGGATATACCATGCTTGACGGAAGCAGCATCATGGAGGATTACCACGGATCT  
CCTCTACCGACCCCGGAGTACGAAGAAGTAGAGCGAATGGACTCACTTCGACTTGATAACTCATCTACCAACTCTTC  
CTGCCGTGGACGAAGCCGGCTGACGACCGATGATTTGACGGCCGAACCGGCGGAATTCGAAAGTCGAAACCGAGCGC  
CATCCGCGGACTCGCATTCGTCA

## Secuencia tag HA-x3

TACCCTTACGACGTTCCCTGACTACGCTTACCCTTACGACGTTCCCTGACTACGCTTACCCTTACGACGTTCCCTGACTA  
CGCT

## Secuencia *ter-cgrA\_AF*

En azul secuencia downstream de *ter-cgrA\_AF* en plásmido pFW9.3

Con fondo amarillo los cebadores:

*ter-cgrA*-Fw 5'-ACAGCAGAAGAATCTCTCTCC-3'

pFW9.3-Rv 5'-CGAAAGGGCCTCGTGATACG-3' (CGTATCACGAGGCCCTTTCCG)

ACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCTGCCATGCATTAACCTTCATCCTACTGTCTACCCGCAGT  
ACCCATTACATTTGCGGCAGATACCAGGTTGTTTTCTATTCCCTCGGTTCTTCAGTTCTTCAGATATTACATTACT  
CGAGAAATTGGCGGCAGATGCAGGAGTTTGGTTGGTTTTAATTGTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGC  
AATGTTTCGACGGAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCATGCGGCCGCGCGTATCACGAGGCCCTTTCCG

## Secuencia Construcción 1 (*PalcA::artA-HAx3::ter-cgrA\_AF*)

En violeta secuencia de HAx3

Con fondo amarillo los cebadores:

NotI-PalcA-Fw 5'AAT**GCGGCCGCT**AAGTCCCTTCGTATTTCTC3' (en negrita sitio de corte de NotI)

PalcA-artA-Fw

5'-CCAATCCTATCACCTCGCCTCAAATGCCCGGCCGTCTTCTTTCCAG-3'

artA-HAx3-Rv

5'-AGCGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTAAGCGTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTAAGC  
GTAGTCAGGAACGTCGTAAGGGTATGACGAATGCGAGTCCGCGGATG-3'

(CATCCGCGGACTCGCATTCGTTCATACCCTTACGACGTTCCCTGACTACGCTT)

HA-*ter-cgrA*-Fw

5'-GACGTTCCCTGACTACGCTTACCCTTACGACGTTCCCTGACTACGCTTACCCTTACGACG  
TTCCTGACTACGCTTGAACAGCAGAAGAATCTCTCTCC-3'

XbaI-ter-cgrA-Rv 5'-**CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC-3'**  
(GGTGAATATACGTCATGAATCATGCTCTAGAGTG) (en **negrita** sitio de corte de *XbaI*)

**AATGCGGCCGCTAAGTCCCTTCGTATTTCTC**CGCCTGTGTGGAGCTACCATCCAATAACCCCCAGCTGAAAAGCTG  
ATTGTGATAGTTCCCACTTGTCCGTCCGCATCGGCATCCGCAGCTCGGGATAGTTCCGACCTAGGATTGGATGCATG  
CGGAACCGCACGAGGGCGGGCGGAAATTGACACACCACTCCTCTCCACGCACCGTTCAAGAGGTACGCGTATAGAG  
CCGTATAGAGCAGAGACGGAGCACTTTCTGGTACTGTCCGCACGGGATGTCCGCACGGAGAGCCACAAACGAGCGGG  
GCCCCGTACGTGCTCTCCTACCCAGGATCGCATCCCCGCATAGCTGAACATCTATATAAAGACCCCCAAGGTTCTC  
AGTCTCACCAACATCATCAACCAACAATCAACAGTTCTCTACTCAGTTAATTAGAACTCTT**CCAATCCTATCACCTC**  
**GCCTCAAAATGCCCGGCCGTCTTCTTTCCAG**CCTAGTTTCGCCCTCCCTTTCTCACCCTCGATCTTCCCTCACTCC  
AACTCTTCTTCGTCTCGTCTGTAAACGAAGTCTCCCAGGCCGCATCTTCCAAGCACTCGCACACTGACAGATCACA  
TTCGCCGGAGCGCCGTCTATCCTTCTCAATGGACCACTTTATCCACACTTACCGGGACCATCACAATAAGGAAAAGC  
ATCGAAAGCACGGACGTTCTCTCGTTCAAAGGAGCGTGGCAGCCATGAGGAAACGGCAGCTTCAGCTAAACTTGAT  
GTCATCGTGGAATCTCCACCTCTTGTGTTGCTATGGAACACGGCGAACTCTACGGGTGCTTTGTTCTCTGGCCGCT  
CAGAATTACCGTACCCGAAGCAACGGGCATGGTCACTTGAACAAGTTGATATGCGCTTGATGATTAGAAAGACGA  
CGAAGAAGCCCGTCTCGAGGGACTGCCCAATTGCGCCTCCAAGACCGAGGAACTGACAACTGGAACCTCCTGACG  
GAACCTCTCCACCTTAGGAGCGGTGACCAGACTTCCCTTTAGTTATCTGTTCCAGGTAACCTGCCGGCGTCGTG  
TAATGGTTCCCTGGGACAGATTGAATATTTCTTCAAGCACACGGACACAATGTGAACGGTGAAGAGTACAATTTTA  
GAATGCCGCTACACATGCGCCGCGCCATTCTCCCAGGGAACGACAAATCCTCAATTCGTATCTTTCCACCCACCAAT  
CTAACTGGCCGCATCGTCTCCATCTGTTGTCACCCAATTGGGACTTTTCCCGTTCAGATGACCTTGAGCGGTGT  
CTTGATAAAGGCGAGGAGACCCAAACGCGTTGGCGGCTACGCAAGATGATGTGGCGGATTGAAGAGCACCAGAAGA  
TTGTCTCAACCGCTTGCCCCAAGCACGCGCACAAAGATTGGTGGCGAAGGAAAGGGCGTTCTGCACCAGGAGACGCGG  
ATCATTGGACACAACGAGGAGAAAGATGGCTGGAAGACAGACTTTGATACCGCTGGAGGCGAGATAAGCATGGAATT  
TGAAGCCAACATTAACCAACCGCCAACCCGGTGTGTGATCTTGAGGCACCGGGTGGACTGGAGACGAAGCACAATT  
TGGTCAATTGAAGTATTGTTGCGGAGGAATTCTGTCAAACCGTAACACCAGACTCATCACTCCAACAGGAGCTGCC  
CGCGTCTTCGCATGCAGTTAACCTGCAGGTTACGGAGAGAAGCGGGCTCGGTATCAGCTGGGATGAGGAGATGCC  
GCCAGTATACGAAGACGTTCCCGCTAGCCCTCCCGGATATAACATGCTTGACGGAAGCAGCATCATGGAGGATTACC  
ACGGATCTCCTCTACCGACCCCGGAGTACGAAGAACTAGAGCGAATGGACTCACTTCGACTTGATAACTCATCTACC  
AACTCTTCCCTGCCGTGGACGAAGCCGGCTGACGACCGATGATTTGACGGCCGAACCGGCGGAATTCGAAAGTCGAAA  
CCGAGCGC**CATCCGCGGACTCGCATTCGTCA****TACCCTTACGACGTTCTTGACTACGCTTACCCTTACGACGTTCTCTG**  
**ACTACGCTTACCCTTACGACGTTCTTGACTACGCTTGA**ACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCT  
GCCATGCATTAACCTTACCTACTGTCTTACCCGAGTACCCATTACATTTGCGGCAGATAACCAGGTTGTTTTCTA  
TTCCCTCGGTTCTTCACTTCTTCAATATACATTAATCTCGAGAAATTGGCGGCGATGCAGGAGTTGGTTGGTTTTA  
ATTGTTTCACTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTCGACGGAAGACTATCTC**GGTGAATATACGTCA**  
**TGAATCATGCTCTAGAGTG**

## Secuencia *linker artA-yfp-C*

CGCCCCGCCTGCAAGATCCCGAACGACCTGAAACAGAAGGTCATGAACCAC

## Secuencia *yfp-C*

**ATG**GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT  
CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC  
AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATC  
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG**TAA**

## Secuencia Construcción 2 (*PalcA::artA::yfp-C::ter-cgrA\_AF*)

En azul secuencia de *palcA*, en negro secuencia de *artA*, en violeta la secuencia del linker, en verde la secuencia de *yfp-C* y en cian la secuencia de *ter-cgrA\_AF*.

Con fondo amarillo los primers:

PalcA-Rv 5'-TTTGAGGCGAGGTGATAGGA-3'

PalcA-seq-Fw 5'-AAGGTTCTCAGTCTCACCAAC-3'

artA-seq1-Fw 5'-TAGGAGCGGTGACCACGACT-3'

artA-seq2-Fw 5'-TTCTGTCCAAACCGTAACAC-3'

artA-yfp-C-Rv

5'-TTCGGGATCTTGCAGGCCGGGCGTGACGAATGCGAGTCCGCGGATG-3'

(CATCCGCGGACTCGCATTTCGTACGCCCCGGCCTGCAAGATCCCGAA)

yfp-c-linker-Fw

5'-CGCCCCGGCCTGCAAGATCCCGAACGACCTGAAACAGAAGGTCATGAACCACATGGC

CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG-3'

yfp-c-ter-cgrA-Rv 5'-GGAGAGAGATTCTTCTGCTGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'

(CATGGACGAGCTGTACAAGTAAACAGCAGAAGAATCTCTCTCC)

ter-cgrA-Fw 5'-ACAGCAGAAGAATCTCTCTCC-3'

NotI-PalcA-Fw 5'**AATGCGGCCGCT**TAAGTCCCTTCGTATTTCTC3' (en negrita sitio de corte de NotI)

XbaI-ter-cgrA-Rv 5'-CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC-3'

(GGTGAATATACGTCATGAATCATGCTCTAGAGTG) (en negrita sitio de corte de XbaI)

AATGCGGCCGCTAAGTCCCTTCGTATTTCTCGCCTGTGTGGAGCTACCATCCAATAACCCCCAGCTGAAAAGCTG  
ATTGTGATAGTTCCCACTGTCCGTCCGCATCCGCAGCTCGGGATAGTTCCGACCTAGGATTGGATGCATG  
CGGAACCGCACGAGGGCGGGCGGAAATTGACACACCACTCCTCTCCACGCACCGTTCAAGAGGTACGCGTATAGAG  
CCGTATAGAGCAGAGACGGAGCACTTTCTGGTACTGTCCGCACGGGATGTCCGCACGGAGAGCCACAAACGAGCGGG  
GCCCCGTACGTGCTCTCCTACCCCAGGATCGCATCCCCGCATAGCTGAACATCTATATAAAGACCCCCAAGGTTCTC  
AGTCTCACCAACATCATCAACCAACAATCAACAGTTCTCTACTCAGTTAATTAGAACTCTTCCAATCCTATCACCTC  
GCCTCAAAATGCCCCGGCCGTCTTCTTTCCAGCCTAGTTTCGCCCTCCCTTTCTCACCCTCGATCTTCCCTCACTCC  
AACTCTTCTTCGTCTCGTCTGTAAACGAAGTCTCCCAGGCCGCATCTTCCAAGCACTCGCACACTGACAGATCACA  
TTCGCCGGAGCGCCGTCTATCCTTCTCAATGGACCACTTTATCCACACTTACCGGGACCATCACAATAAGGAAAAGC  
ATCGAAAGCACGGACGTTCTCTCGTTCAAAGGAGCGTGGCAGCCATGAGGAAACGGCAGCTTCAGCTAACTTGAT  
GTCATCGTGGAAATCTCCACCTCTTGTGTTGCTATGGAACACCGGCGAACTCTACGGGTGCTTTGTTCTCTGGCCGCT  
CAGAATTACCGTACCCGAAGCAACGGGCATGGTCATCCTTGACAAGTTCGATATGCGCTTGATGATTAGAAAGACGA  
CGAAGAAGCCCGTCTCGAGGACTGCCCAATTGCGCCTCCAAGACCGGAACTGACAAACTGGAACCTTCCCTGACG  
GAACCTCTCCACCTTAGGAGCGGTGACCACGACTTCCCTTTTCAGTTATCTGTTCCAGGTAACCTGCCGGCGTCGTG  
TAATGGTTCCCTGGGACAGATTGAATATTTCTTCAAGCACACGGACACAATGTGAACGGTGAAGAGTACAATTTTA  
GAATGCCGCTACACATGCGCCGCGCCATTCTCCAGGGAACGACAAAATCCTCAATTCGTATCTTTCCACCCACCAAT  
CTAACTGGCCGCATCGTCTCCCATCTGTTGTCCACCAATTTGGGACTTTTCCCGTTCAGATGACCTTGAGCGGTGT  
CTTGATAAAGGCGAGGAGACCCAAACGCGTTGGCGGCTACGCAAGATGATGTGGCGGATTGAAGAGCACCAGAAGA  
TTGTCTCAACCGCTTGCCCCAAGCACGCGCACAAGATTGGTGGCGAAGGAAAGGGCGTTCTGCACCAGGAGACGCGG  
ATCATTGGACACAACGAGGAGAAAGATGGCTGGAAGACAGACTTTGATACCGCTGGAGGCGAGATAAGCATGGAATT  
TGAAGCCAACATTAACCAACCGCCAACCCGTTGTGATCTTGAGGCACCGGGTGGACTGGAGACGAAGCACAATT  
TGGTCAATTGAAGTATTGTTGCGGAGGAAATCTGTCCAAACCGTAACACAGACTCATCACTCCAACAGGAGCTGCC  
CGCGTCTTCGCATGCAGTTTAACTGCACGTTACGGAGAGAAGCGGGCTCGGTATCAGCTGGGATGAGGAGATGCC  
GCCAGTATACGAAGACGTTCCCGCTAGCCCTCCCGGATATACCATGCTTGACGGAAGCAGCATCATGGAGGATTACC  
ACGGATCTCCTTACCGACCCCGGAGTACGAAGAACTAGAGCGAATGGACTCACTTCGACTTGATAACTCATCTACC  
AACTCTTCTGCGTGGACGAAGCCGGCTGACGACCGATGATTTGACGGCCGAACCGGCGGAATTCGAAAGTCGAAA  
CCGAGCGCCATCCGCGGACTCGCATTCGTCAAGCCCGGCTGCAAGATCCCGAACGACCTGAAACAGAAGGTCATGA  
ACCACATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG  
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAG  
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGACCCGCCGCCG

GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCTGCC  
ATGCATTAACCTTCATCCTACTGTCCTACCCGCAGTACCCATTCACATTTGCGGCAGATACCAGGTTGTTTTCTATT  
CCTCGGTTCTTCAGTTCTTCAGATATTACATTACTCGAGAAATTGGCGGCATGCAGGAGTTTGGTTGGTTTTAATT  
GTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTCGACGGAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGA  
ATCATGCTCTAGAGTG