

Universidad de la República
Facultad de Química - Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología - Subárea Microbiología

**Relaciones estructura-función de
transportadores de purinas de
Basidiomycotas**

Mag. Mariana Barraco Vega

*Manuscrito presentado para la obtención del título de Doctor en Ciencias
Biológicas*

Orientadores

Dra. Gianna Cecchetto

Dr. Manuel Sanguinetti

Noviembre 2021

Manuscrito titulado “Relaciones estructura-función de transportadores de purinas de Basidiomycotas” presentado por Mag. Mariana Barraco Vega para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Director: Dra. Gianna Cecchetto, Microbiología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Co-director: Dr. Manuel Sanguinetti, Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Tribunal:

Dra. Beatriz Garat, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Presidente)

Dra. Ana Ramón Pacheco, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Vocal)

Dra. Sonia Rodríguez Giordano, Facultad de Química, Universidad de la República (Vocal)

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que formaron parte de mi vida durante todos estos años.

A mí familia, sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A Juanchi, por ser mi compañero también en esto, por bancarme TODOS los malos humores, el stress, los llantos y todas las frustraciones. Ésta es una más de las razones por las que te elegí y te sigo eligiendo, te amo.

A mis hijos, por hacerme feliz siempre a pesar de todo, a Agus por su creatividad y a Bruno por su persistencia frente a los desafíos, los amo hasta el infinito y más allá.

A mis padres por siempre sentirse orgullosos de mí y motivarme a hacer lo que me haga feliz, gracias también por ser los mejores abuelos y niños del mundo.

A mis tutores por acompañarme en este viaje.

A Gianna por SIEMPRE, SIEMPRE confiar en mí, por ser mucho más que mi tutora.

A Manuel por la respuesta a tantos mails y muchas, muchas gracias por todas las correcciones del manuscrito.

A todos los integrantes de Micro FQ, los viejos los nuevos, los de siempre, por tantos momentos compartidos ¡Extraño las masitas y los festejos de cumple con la torta sobre papel azul! Especialmente quiero agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular por hacer que el 12 sea un TAN, TAN lindo lugar de trabajo. A las jefas GC, SRG, MIS y MJP por apoyarme siempre y a todos los PEONES por ser un grupo humano tan lindo. A Gaby por las charlas, llantos, risas por tantos audios (pensar que fuiste tu quien me mostró las ventajas de ese mágico mundo al que me negaba) y también por toda la ayuda con los modelos. A Bel por se mi compañera de extensión favorita, por ser tan, tan linda persona siempre y por conseguirme el programa para las figuras.

Al Área de Radioquímica, por permitirme usar el equipo de centelleo sin el cual no hubiera podido hacer los *uptakes*. Especialmente a Mariella por ayudarme con la compra de los radioactivos y a Leticia, Ivana y Emilia por ayudarme y siempre recibirme con la mejor onda.

A la sección Bioquímica de Facultad de Ciencias especialmente a Manuel, Ana y a todo el laboratorio 313 por recibirme para hacer la extracción de proteínas y los *western* aún en época de pandemia.

A todos mis estudiantes por hacer que siempre tenga ganas de aprender más, y a Juliette, Angela y Agustina también por toda su ayuda.

A Mag por introducirme en el mundo de Zotero que tanto me simplificó la

A la ANII, CAP y CSIC por darme las becas y financiar los proyectos que me permitieron realizar este Doctorado.

Prólogo

Hace un tiempo un tío le regaló a mi hijo Bruno dos puzzles con la temática de granja. Desde ese día Bruno desarrollo fascinación por los puzzles, hemos armado todos los que tenemos en casa una y otra vez y lo he visto armar los puzzles de granja muchas veces. También en estos últimos días sacamos con mi hija Agus el primer cuento de su colección (así lo describe ella) titulado “Perla y el cocodrilo” siendo ella la autora e ilustradora y yo la editora. Así es que entre tanto puzzle y cuento me dieron muchas ganas de contarles la historia de mi doctorado en términos del cuento “Mariana y el puzzle de granja”.

Cuando Mariana terminó su Maestría tenía todas las piezas de un puzzle de granja y habían salido publicados varios artículos donde armaban puzzles similares y con eso mostraban el rol de diferentes partes del puzzle. Una linda continuación del trabajo de maestría de Mariana implicaba entender el rol de las diferentes piezas del puzzle de granja ya que hasta ese momento nadie había armado uno igual. Así fue que Mariana y su orientadora (que no sabían armar puzzles) compararon las piezas del puzzle de granja con las piezas de otros similares (que tampoco estaban armados) y observaron que había muchas piezas que estaban en todos (partes de animales, partes de sol), otros que estaban en muchos (partes de un establo, partes de nubes) otros que estaban solo en algunos y seleccionaron algunas piezas que solo estaban en los puzzles de granja como el de ellas (tallos de alguna plantas, pétalos de alguna flor, el pico de algún animal). Pensaron que les sería muy útil conseguir la ayuda de alguien que supiera armar puzzles y que Mariana podría mediante su Doctorado probar la función de algunas piezas del puzzle de granja. A Mariana al principio no le convencía mucho el hecho de no saber armar puzzles, pero mucha gente exitosa utilizaba la estrategia de conseguir “armadores de puzzles” así que contactaron uno y escribieron un proyecto. Cuando el proyecto resultó financiado Mariana se convenció de que tenía que hacer su Doctorado en ese tema. El trabajo del armador de puzzle permitió encastrar varias piezas, muchas figuras de granja ya se dejaban ver (La vaca, el chanco), pero las piezas que habían seleccionado seguían estando sueltas. Por ese tiempo otro equipo publicó el armado de un puzzle de granja muy similar y habían probado la función de algunas piezas claves que estaban en todos los puzzles similares como las patas de la vaca, los rayos del sol, el ojo del chanco, pero nada decían sobre otras partes que no eran tan evidentes como los tallos de plantas, pétalos de flores o el pico de algún animal que se veía en un lago. Así fue que Mariana decidió que no importaba que ya hubieran

publicado el armado de ese puzle que en el doctorado tenía que hacer foco en las otras piezas del puzle, aunque eso implicará trabajar con partes del puzle que no eran tan fáciles de armar. Con el trabajo de Mariana llegaron a concluir que algunas de las piezas que habían seleccionadas son indispensables para el puzle de granja y que cuando se cambian por otras, la granja cambia, pero eran piezas que el armador de puzle no pudo encastrar. En ese momento Mariana se sentía muy desilusionada con sus resultados mientras veía que otros armaban puzles de sillas, de autos y eso les permitía asignar la función de cada una de sus partes. Y entre todo esto sintió la necesidad de encontrar la manera de que las piezas encastraran para sentirse feliz. Probó con otros armadores, con otras formas de armado, hizo un curso donde enseñaban estrategias para armado de puzles, pero las piezas seguían sin encastrar. Mariana se sentía muy triste hasta que AL FIN logró entender que armar un puzle de 50 piezas no es lo mismo que armar uno de 500, que proponer la función que cumple una pieza de la rueda en un puzle de auto no es lo mismo que proponer la función que puede tener el tallo de una planta en un puzle de granja. Hasta que un día entendió que los puzles con paisajes como el de granja eran mucho más difícil de armar que los que solo tienen un objeto como un auto, y así se convenció de que tenía muy buenos resultados. Que no importaba que las piezas no encastraran del todo, que con sus resultados había podido llegar a concluir muchas cosas. Había concluido que el tallo que veían era de una planta de tomate que era indispensable para el granjero, que el pétalo formaba parte de una flor que les podría servir a las abejas para hacer miel y que el pico es parte de un pato que, aunque no tienen idea de porque es tan importante, cuando el pato no está la granja es otra. Así Mariana se sintió feliz de que sus resultados permitían explicar muchas cosas de piezas que no encastran en los puzles y que tal vez algún día algún armador de puzles que pueda dedicarse tiempo completo a armar el puzle de granja pueda llegar a encastrar todas las piezas de Mariana.

Resumen

Las purinas son compuestos nitrogenados esenciales para la célula. Componen los ácidos nucleicos, son necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos y coenzimas e intervienen en el mantenimiento del *pool* energético bajo la forma de ATP y GTP. Además, muchos microorganismos pueden utilizarlas como fuente de nitrógeno para lo cual cuentan con las enzimas catabólicas correspondientes y transportadores específicos que permitan su entrada a la célula. La importancia de estos transportadores radica no solo en proveer al organismo de compuestos esenciales, sino también en que son determinantes de la sensibilidad de los mismos frente a citotóxicos y análogos de purinas mutagénicos.

Para la captación de purinas, los hongos poseen dos sistemas principales agrupados en familias funcional y evolutivamente distintas: NAT y *AzgA-like*. Ambas familias se han definido históricamente a través de las permeasas de *Aspergillus nidulans*. La familia NAT está ampliamente caracterizada, y el análisis de una amplia gama de mutantes ha permitido identificar residuos claves que respaldan un modelo estructural con una proteína cristalizada. La familia *AzgA-like*, es la menos estudiada. El presente trabajo contribuye al conocimiento de los determinantes estructurales de la función de estos transportadores, especialmente de las proteínas de la familia *AzgA-like* utilizando como modelo los transportadores de los Basidiomycotas degradadores de madera *Phanerochaete chrysosporium* (organismo modelo) y *Punctularia atropurpurascens* (grupo filogenético más distante y hasta ahora no explorado).

Ambos Basidiomycotas tienen un transportador perteneciente a la familia *AzgA-like* y otro perteneciente a la familia NAT. Mediante modelado por homología se determinó que la estructura tridimensional de los dos transportadores de *P. chrysosporium* consiste en 14 segmentos transmembrana que se agrupan espacialmente en dos dominios entre los cuales se encuentra la cavidad donde se uniría el sustrato. Esta estructura es muy similar a la que está planteada para los homólogos de *A. nidulans* si bien este trabajo propone que las permeasas de *P. chrysosporium* tienen diferentes sitios de unión al sustrato.

En el presente trabajo se analizaron variantes de estos transportadores mutados en residuos seleccionados en base a análisis comparativo de secuencias, modelado estructural por homología y mutagénesis al azar. Las versiones silvestres y mutantes se

expresaron en un mismo contexto genético: cepa de *A. nidulans* que carece de los principales transportadores de purinas propios. De cada variante se seleccionó una cepa monocopia (número de copias determinado por qPCR) y se analizó: ubicación subcelular (mediante la fusión a GFP), el transporte de diferentes sustratos mediante crecimiento y ensayos de captación con purinas marcadas radioactivamente (*uptakes*), y nivel proteico producido (*western blot*). Algunas de las mutaciones analizadas provocaron que las proteínas perdieran totalmente la capacidad de transportar mientras que otras aumentaron o disminuyeron la eficiencia de transporte. Los resultados obtenidos se analizaron junto a los modelos tridimensionales construidos y se identificaron residuos claves para la función y para el tránsito hacia la membrana celular. Respecto al transportador *AzgA-like* de *P. atropurpurascens* en este trabajo se completó la secuencia del transportador de purinas perteneciente a esta familia mediante amplificación con *primers* degenerados, RACE-PCR, secuenciado y análisis transcriptómicos. De la secuencia obtenida se deduce una proteína de 575 residuos aminoacídicos que posee los 35 residuos invariantes y los cuatro motivos conservados que caracterizan a la familia *AzgA-like*. Esta presenta alta similitud con el homólogo de *P. chrysosporium* y a nivel estructural las principales diferencias se encontrarían en el dominio carboxilo terminal.

Este trabajo contribuye al estudio de estas proteínas, caracterizando transportadores de purinas en hongos cuyo hábitat natural es muy limitante en lo que refiere a disponibilidad de nitrógeno, y por lo tanto es una contribución al conocimiento de las adaptaciones que permiten a microorganismos Basidiomycotas responder a la limitación de nitrógeno.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico copia producto de la transcripción reversa de ARNm
ADNg	Ácido desoxiribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Trifosfato de adenosina
CMAC	7-amino-4-clorometil coumarin
Ct	Ciclo umbral
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa	Desoxiribonucleasa
dNTPs	2-Deoxinucleótidos 5'trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-ácetico
GFP	Proteína verde fluorescente
GTO	Trifosfato de guanosina
Paba	p-Amino Benzoico
Kb	Kilobases
MVB	Cuerpos multivesiculares
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pyro	Piridoxina HCl
RT-qPCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa
RACE	Amplificación Rápida de extremos de ADNc
RE	Retículo endoplasmático
Ribo	Riboflavina
RNAsa	Ribonucleasa A
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
STM	Segmento transmembrana
TBE	Buffer Tris Borato
TE	Buffer Tris EDTA

Índice de Contenido

1	Introducción general.....	8
1.1	Transportadores de membrana plasmática.....	9
1.2	Síntesis y regulación del tráfico intracelular de transportadores	12
1.3	Acercamiento a las relaciones estructura -función de un transportador	17
1.4	Transportadores de purinas	22
1.5	<i>Aspergillus nidulans</i> : Modelo para el estudio de transportadores	24
1.5.1	Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i>	25
1.5.2	Ensayos de transporte	27
1.5.3	Contexto genético	28
1.5.4	Seguimiento <i>in vivo</i> mediante marcado fluorescente	29
1.5.5	Vía de degradación de purinas.....	30
1.6	Regulación transcripcional de los transportadores de fuentes nitrogenadas....	32
1.7	UapA: un transportador modelo	35
1.8	Otros transportadores de <i>A. nidulans</i>	41
1.9	Transportadores de purinas de Basidiomycotas.....	42
2	Análisis de PhZ	49
2.1	Introducción	50
2.2	Objetivos del capítulo	54
2.2.1	Objetivo general:	54
2.2.2	Objetivos específicos:.....	54
2.3	Resultados	55
2.3.1	Selección de residuos candidatos mediante análisis comparativo de secuencias.....	55

Relaciones estructura-función de transportadores de purinas de Basidiomycotas

2.3.2	Selección de residuos candidatos mediante análisis de la estructura tridimensional.....	57
2.3.3	Generación y análisis de mutantes de PhZ.	61
2.3.4	Análisis del transporte en PhZ mutantes.	64
2.3.5	Perfil de sustratos en mutantes PhZ.....	68
2.3.6	Expresión y localización de versiones mutantes de PhZ.....	71
2.3.7	Modelado del transportador PhZ.....	74
2.4	Discusión y perspectivas.....	84
2.5	Conclusiones.....	94
3	Análisis de PhU.....	96
3.1	Introducción.....	97
3.2	Objetivos del capítulo.....	99
3.2.1	Objetivo general.....	99
3.2.2	Objetivos específicos:.....	100
3.3	Resultados.....	100
3.3.1	Identificación de residuos críticos para PhU.....	100
3.3.2	Modelado del transportador PhU.....	104
3.3.3	Generación de cepas de <i>A. nidulans</i> que expresen versiones mutantes de PhU. 113	
3.4	Discusión y Perspectivas.....	116
3.5	Conclusiones.....	123
4	Análisis de PuZ.....	125
4.1	Introducción.....	126
4.2	Objetivos del capítulo.....	129
4.2.1	Objetivo general:.....	129
4.2.2	Objetivos específicos:.....	129
4.3	Resultados.....	130
4.3.1	Identificación de la secuencia del gen <i>puZ</i>	130

Relaciones estructura-función de transportadores de purinas de Basidiomycotas

4.3.2	Construcción de <i>A. nidulans</i> :: <i>puZ</i>	137
4.4	Discusión y Perspectivas	139
4.4.1	Análisis <i>in silico</i> de posibles proteínas de la ruta catabólica de las purinas y proteína reguladoras.	141
4.5	Conclusiones	143
5	Conclusión general.....	144
6	Materiales y Métodos	147
6.1	Cepas.....	148
6.2	Medios de cultivo.....	149
6.2.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	150
6.2.2	<i>Escherichia coli</i>	153
6.3	Plásmidos	153
6.4	Primers.....	154
6.5	Técnicas empleadas con <i>A. nidulans</i>	160
6.5.1	Análisis de crecimiento en placa	160
6.5.2	Obtención de cultivo monospórico (siembra por suspensión de esporas) 160	
6.5.3	Cultivo en medio líquido	160
6.5.4	Transformación de <i>A. nidulans</i>	161
6.5.5	Microscopía de fluorescencia	162
6.5.6	Ensayos de captación de purinas radiomarcadas (<i>uptakes</i>)	163
6.5.7	Técnicas empleadas con ácidos nucleicos	164
6.5.8	Preparación de las muestras para aislamiento de ácidos nucleicos.	164
6.5.9	Extracción de ADN genómico de hongos	164
6.5.10	Extracción de ARN total.....	165
6.5.11	Extracción de ADN plasmídico	165
6.5.12	Síntesis de ADNc	166
6.5.13	RACE (Rapid amplification of cDNA ends).....	166

Relaciones estructura-función de transportadores de purinas de Basidiomycotas

6.5.14	Amplificación mediante PCR convencional.....	166
6.5.15	Fusion-PCR	167
6.5.16	Amplificación mediante PCR en tiempo real.....	168
6.5.17	Mutagénesis sitio dirigida.....	168
6.5.18	<i>Cassette</i> de transformación.....	169
6.5.19	Purificación de productos de PCR.....	171
6.5.20	Electroforesis de ADN.....	171
6.5.21	Clonado en vector T	172
6.5.22	Precipitación de los productos de ligación con ARN-t.....	172
6.5.23	Transformación de células de <i>E. coli</i> mediante electroporación	173
6.5.24	Preparación de células electrocompetentes	173
6.5.25	Síntesis génica	173
6.5.26	Secuenciación de ADN.....	174
6.6	Técnicas de estudio de proteínas.....	174
6.6.1	Extracción de proteínas totales	174
6.6.2	Análisis de las muestras por SDS-PAGE	175
6.6.3	<i>Western blot</i>	176
6.7	Análisis Bioinformáticos	176
6.7.1	Ensamblaje del transcriptoma.....	176
6.7.2	Análisis de secuencias <i>in silico</i>	177
6.7.3	Modelos estructurales.....	179
6.7.4	Análisis de variantes correlacionadas.....	181
6.7.5	Ensayos de acoplamiento molecular <i>in silico</i> (<i>docking</i>)	181
7	Bibliografía.....	182

Índice de Figuras

Figura 1-1: Esquema transportadores y canales.	9
Figura 1-2: Tipos de transportadores de membrana.	11
Figura 1-3: Representación esquemática de tráfico de transportadores en células de <i>Aspergillus</i>	14
Figura 1-4: Modelo de estados conformacionales.	19
Figura 1-5: Esquema de diferentes modelos para la alternancia entre la conformación abierta y cerrada de un transportador.	21
Figura 1-6: Estructura química de purinas.	22
Figura 1-7: Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i>	26
Figura 1-8: Vía de degradación de las purinas en <i>A. nidulans</i>	31
Figura 1-9 Esquema regulación transcripcional de transportadores de purinas.	34
Figura 1-10: Residuos críticos del transportador UapA.	36
Figura 1-11: Interacciones UapA-sustrato. Representación esquemática de interacción xantina-UapA.	37
Figura 1-12: Residuos críticos para la especificidad del sustrato.	38
Figura 1-13: Estructura del dímero UapA.	40
Figura 1-14: Expresión relativa de <i>phZ</i> y <i>phU</i> en respuesta a las diferentes fuentes de nitrógeno.	45
Figura 1-15: Ensayos de crecimiento de cepas de <i>A. nidulans</i> que expresan PhZ, PhU, AzgA y UapA fusionados a GFP.	46
Figura 1-16: Microscopía de epifluorescencia de cepas que expresan fusiones PhZ-GFP y PhU-GFP.	47
Figura 2-1 Análisis de PhZ, y homólogos <i>AzgA-like</i> con función conocida.	53
Figura 2-2: Interacciones AzgA-sustrato.	53
Figura 2-3: Aminoácidos presentes en los motivos <i>AzgA-like</i>	57
Figura 2-4: Identificación de residuos candidatos en base al modelado tridimensional.	59
Figura 2-5: Interacción PhZ-hipoxantina.	60
Figura 2-6: Interacción PhZ-8-azaguanina.	61
Figura 2-7: Localización de residuos de PhZ analizados.	63
Figura 2-8: Análisis de crecimiento de mutantes PhZ.	65
Figura 2-9: Velocidad inicial de transporte de ³ H-hipoxantina en mutantes de PhZ y cepas controles.	66

Figura 2-10: Caracterización cinética de mutantes PhZ:.....	67
Figura 2-11: Ensayos de transporte de [³ H]-hipoxantina en mutantes PhZ en presencia de otros sustratos no marcados:.....	69
Figura 2-12:	70
Figura 2-13: Localización subcelular <i>in vivo</i> de mutantes de PhZ por microscopía de epifluorescencia.	73
Figura 2-14: <i>Western Blot</i> de proteínas totales de mutantes PhZ-GFP.	74
Figura 2-15: Alineamiento de PhZ vs UapA utilizado para el modelado.	75
Figura 2-16: Modelo de PhZ.	76
Figura 2-17: Perfil electroestático de PhZ.	77
Figura 2-18: Mapa de variantes correlacionadas.	78
Figura 2-19: Interacción PhZ-hipoxantina.	80
Figura 2-20: Interacción PhZ-8-azaguanina.	80
Figura 2-21: Interacción PhZ-hipoxantina.	82
Figura 2-22: Interacción PhZ-8-azaguanina.	83
Figura 2-23: Localización de residuos mutagenizados en estructura 3D modelada de PhZ:.....	84
Figura 3-1: Diagrama topológico de UapA.	98
Figura 3-2: Análisis de PhU, y homólogos NAT de función conocida.	103
Figura 3-3: Modelo PhU.	105
Figura 3-4: Perfil electroestático PhU _{UapA}	105
Figura 3-5: Se muestra un acercamiento a los residuos destacados.	107
Figura 3-6: Interacción PhU-xantina.	109
Figura 3-7: Interacción PhU-ácido úrico.	110
Figura 3-8: Interacción PhU-xantina obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular <i>in silico</i> (<i>docking</i>).	111
Figura 3-9: Interacción PhU-ácido úrico obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular <i>in silico</i> (<i>docking</i>).	112
Figura 3-10: Análisis de crecimiento en placa de los transformantes obtenidos:	114
Figura 3-11: Localización subcelular <i>in vivo</i> de mutantes de PhU por microscopía de epifluorescencia.	115
Figura 3-12: Velocidad inicial de transporte de [³ H]-xantina en mutantes de PhU y cepas controles.	116

Figura 3-13: Se esquematiza la ubicación de los residuos de PhU analizados en este trabajo.	120
Figura 4-1: Crecimiento en purinas de <i>P. chrysosporium</i> (A) y <i>P. atropurpurascens</i> (B).	126
Figura 4-2: Secuencia parcial de PuZ.....	127
Figura 4-3: Alineamiento PuZ y homólogos AzgA-like.	128
Figura 4-4: Secuencia de <i>puZ</i>	132
Figura 4-5: Alineamiento PuZ y otras proteínas AzgA-like.....	134
Figura 4-6: Análisis del extremo 5' de <i>puZ</i>	135
Figura 4-7 : Estructura PuZ.....	136
Figura 4-8: Esquema de la construcción del <i>cassette</i> 5'UTR_ <i>azgA-puZ-gfp-riboB</i> - 3'UTR_ <i>azgA</i>	138
Figura 4-9: Evaluación de cepa <i>A. nidulans::puZ</i>	139
Figura 6-1: Secuencia genes <i>phZ</i> y <i>phU</i>	159
Figura 6-2: Esquema de la construcción del <i>cassette</i> 5'UTR_ <i>azgA-phZ_mutado-gfp-riboB</i> - 3'UTR_ <i>azgA</i>	170
Figura 6-3: Esquema de la construcción del <i>cassette</i> 5'UTR_ <i>azgA-phU_mutado-gfp-riboB</i> - 3'UTR_ <i>azgA</i>	171

1 Introducción general

1.1 Transportadores de membrana plasmática

Toda célula necesita comunicarse con su entorno, esta comunicación se logra mediante el control de la captación y salida de pequeñas moléculas. Para ello son necesarias proteínas transmembrana especializadas que median la translocación de los solutos (nutrientes, metabolitos e iones) y se clasifican en dos tipos principales: transportadores de solutos y canales iónicos (Figura 1-1). Las proteínas de transporte están constituidas por un número variable de dominios hidrofóbicos que se insertan en la membrana plasmática, denominados dominios o segmentos transmembrana (STM). El número de STM puede ir desde uno pocos hasta hasta alrededor de veinte (Gouaux, 2005; Rudnick, 2013).

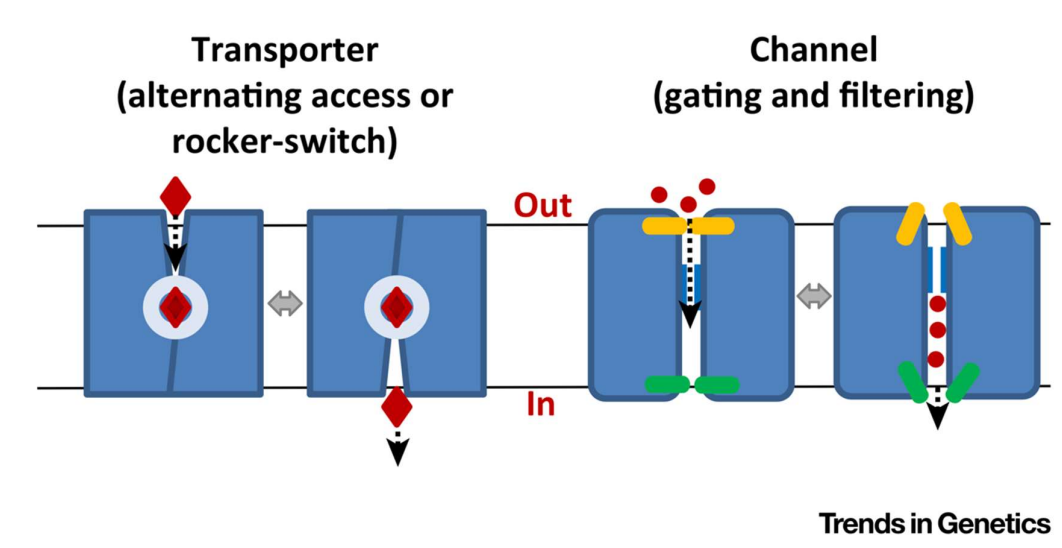


Figura 1-1: Esquema transportadores y canales. Extraído de (Diallinas, 2016)

Los transportadores (*carriers*, *porters* o permeasas) realizan un transporte selectivo de solutos. Poseen un sitio de unión principal que interactúa con los 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. La base de este modelo (“acceso alterno”) se estableció en la década del 1950 y en años más recientes obtuvo el apoyo experimental que le da sustento. En su forma conceptual más simple, el mecanismo del modelo de acceso alterno es el de un interruptor basculante (Abramson, 2003; Huang, 2003; Mitchell, 1957; Patlak, 1957). Los transportadores se asemejan a las enzimas, su funcionamiento depende de interacciones específicas de sustratos con residuos de un único sitio de unión y, por lo tanto, su actividad

Introducción general

se caracteriza por la cinética de Michaelis-Menten (Klingenberg, 2007; Mirza et al., 2006). Los transportadores son estructural y funcionalmente distintos de los canales iónicos, que son proteínas transmembrana que forman poros selectivos controladas por la apertura y cierre simultáneos de "compuertas". Este mecanismo opera en respuesta a diversas señales bioquímicas, biofísicas, eléctricas y mecánicas. La selectividad del canal se controla mediante "filtros moleculares" que restringen el tamaño de los poros que se encuentran cerca de la compuerta que mira hacia afuera. No poseen un sitio de unión de sustrato (ión) específico y no sufren cambios conformacionales durante el pasaje de sustratos. Cuando están abiertos, los canales trasladan rápidamente los iones impulsados por su un gradiente electroquímico sin requerimiento de energía metabólica (Gouaux, 2005).

Los transportadores pueden ser facilitadores (transporte independiente de la energía, similar a los canales), transportadores activos primarios (requieren hidrólisis de ATP para su función), o transportadores activos secundarios (Figura 1-2). Estos últimos acoplan el transporte energéticamente desfavorable del sustrato, con un simportador o antiportador de iones energéticamente favorable o un segundo sustrato. Los simportadores transportan el sustrato e iones en la misma dirección y los antiportadores transportan el sustrato e iones en direcciones opuestas (Saier, 1999).

Transportadores y canales median la translocación de solutos a través de las membranas, cumpliendo funciones relacionadas con la nutrición, señalización, comunicación, neurotransmisión, resistencia al estrés, defensa, homeostasis, desintoxicación y resistencia a fármacos. Su mal funcionamiento está relacionado con varias enfermedades humanas (por ejemplo, fibrosis quística, diabetes y defectos de la neurotransmisión) (César-Razquin et al., 2015; DiFrancesco & DiFrancesco, 2015; Wong et al., 2014). Su importancia para el funcionamiento celular también se refleja en que un 8-10% de los genes de la mayoría de los genomas codifican para proteínas transportadoras (Ren et al., 2007). En el caso de los hongos filamentosos este porcentaje asciende a 10-12%, por esta razón estos organismos se consideran los "campeones" de los transportadores (Diallinas, 2016).

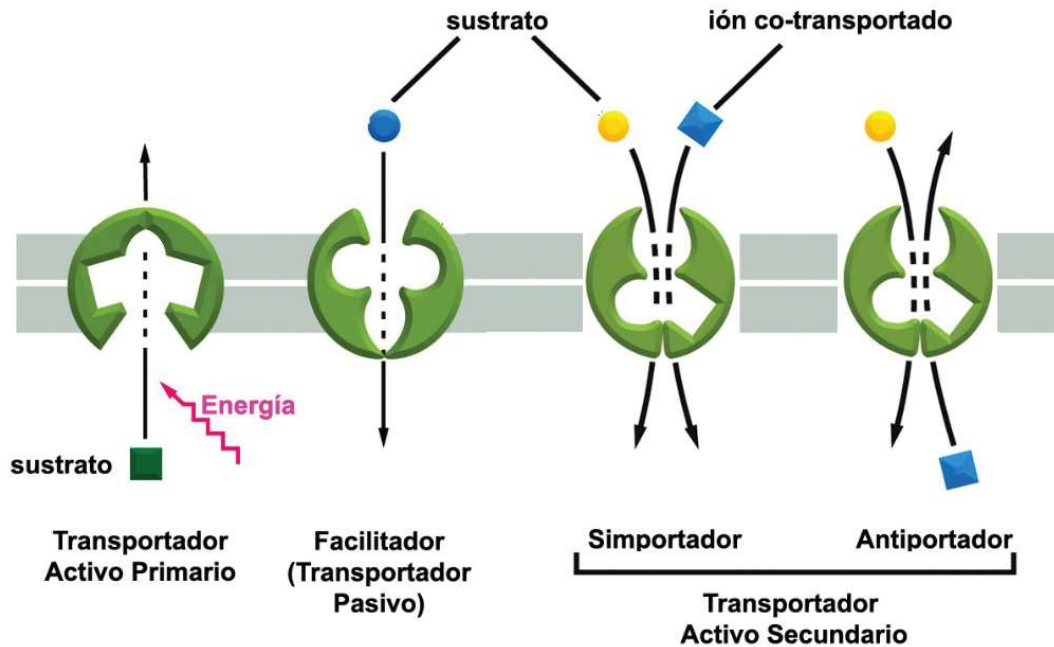


Figura 1-2: Tipos de transportadores de membrana. Se esquematizan los distintos tipos de transportadores de membrana. Los transportadores activos primarios utilizan la energía liberada por una fuente primaria (por ejemplo hidrólisis de ATP) para translocar su sustrato. Los transportadores activos secundarios utilizan la energía almacenada en un gradiente electroquímico de iones para translocar el sustrato, pudiendo ser simportadores o antiportadores según si el transporte del ión y sustrato ocurre en la misma dirección o en direcciones opuestas. El facilitador es capaz de transportar solamente si el sustrato se encuentra a favor de su gradiente de concentración. Extraído y modificado de (Alberts 2008).

Análisis *in silico* realizados con los genomas disponibles de *Aspergillus*, indican que poseerían más de 120 familias diferentes de transportadores. Entre los cuales algunos son específicos de *Aspergillus*, algunos específicos de hongos, algunos específicos de microbios y otros ubicuos en todos los dominios de la vida (Diallinas, 2016). La mayoría de los transportadores de metazoos tienen proteínas fúngicas homólogas y mecanismos aparentemente similares para su expresión subcelular y regulación del recambio. Por esta razón los hongos son utilizados como modelo para el estudio de transportadores, y las metodologías para su análisis (estudios fisiológicos, genéticos clásicos y bioquímicos) tienen una larga historia (Diallinas, 2008a; Pantazopoulou & Diallinas, 2007). De hecho, los primeros transportadores eucariotas, específicos de aminoácidos, bases nucleotídicas o amonio fueron identificados en *Saccharomyces cerevisiae* (revisión Barnett, 2008), *Aspergillus nidulans* (Darlington & Scazzocchio, 1967; Kinghorn & Pateman, 1975; Pateman et al., 1974) y *Neurospora crassa* (Kappy & Metzberg, 1967).

1.2 Síntesis y regulación del tráfico intracelular de transportadores

Los transportadores eucariotas, son translocados co-traduccionamente de los ribosomas a la membrana del retículo endoplasmático (RE), a través del complejo proteico translocón Sec61 (Nyathi et al., 2013; Voorhees & Hegde, 2016). Esta translocación directa al entorno hidrofóbico de la membrana del RE permite que los transportadores se plieguen correctamente y adquieran su conformación funcional. Este proceso de translocación co-traducciona que acopla traducción y plegamiento proporciona un punto de control de calidad primario ya que las proteínas de membrana mal plegadas son retenidas en la membrana del RE y se desencadenan mecanismos que conducen a su degradación, como la degradación asociada al RE (ERAD) (Christianson & Ye, 2014; Preston & Brodsky, 2017; Wu & Rapoport, 2018) o la autofagia selectiva mediada por chaperonas (Evangelinos et al., 2016).

En todos los casos, los ribosomas que sintetizan transportadores (u otras proteínas de membrana) necesitan adherirse al complejo translocón en el RE. La evidencia ha sugerido que el primer segmento transmembrana (STM) traducido interactúa con la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y probablemente otras chaperonas, y guía los ribosomas al translocón (Aviram & Schuldiner, 2017; Patterson et al., 2015). Posteriormente, otros STM también parecen actuar como señales para un plegado adecuado durante la translocación al RE (Aviram & Schuldiner, 2017; Patterson et al., 2015; Skach, 2009). Versiones truncadas de transportadores que carecen del STMS o varios otros STM, se pueden insertar en el RE, pero nunca salir de él, y a menudo son degradados por ERAD (Juanes et al., 2010; Vlanti et al., 2006). Por tanto, parece que la entrada no requiere de señales específicas, sino un grado mínimo de hidrofobicidad proporcionada por al menos dos STM, mientras que la salida es mucho más exigente, ya que requiere interacciones multivalentes específicas de los transportadores con proteínas de la maquinaria de salida del RE (como el complejo de recubrimiento COPII) y lípidos de membrana específicos, necesarias para promover la curvatura de la membrana del RE y, la formación y liberación de vesículas secretoras recubiertas (Borgese, 2016; Klinkenberg et al., 2014; Sato & Nakano, 2007; Zanetti et al., 2012). Para que se den estas interacciones se requiere un plegado adecuado del transportador, que en varios casos también es necesario para una adecuada homo-oligomerización (Martzoukou et al., 2015; Springer et al., 2014). En

Introducción general

resumen, los transportadores se insertan co-traduccionalmente en la membrana del RE y, si se pliegan correctamente, salen del RE incrustados en las vesículas COPII (Figura 1-3).

Después de la formación de vesículas, los pasos posteriores conducen al desvestimiento de las vesículas de transporte y al reciclaje de componentes de COPII. El proceso de salida del RE a menudo requiere un contexto específico dependiente de motivos de secuencia en los transportadores, localizados comúnmente en sus extremos citosólicos (Mikros & Diallinas, 2019). Las señales suelen ser secuencias cortas variables, como diácido (D/E-X-D/E), hidrófobo y aromático (FF, YY, LL, FY, $\Phi X \Phi X \Phi$ – Φ indica residuo aromático y X cualquier aminoácido) u otros motivos cortos más variables. Estos motivos son esenciales para el reconocimiento por Sec24, la proteína adaptadora de COPII (Miller et al., 2003; Otsu et al., 2013; Peng et al., 1999; Springer & Schekman, 1998).

En células de mamíferos, se sabe que después de la salida de RE, vesículas COPII trasladan las proteínas de membrana a un compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), formado por una red de membranas que funciona como una puerta al Golgi (Ito et al., 2012). El transporte de RE a ERGIC depende de los microtúbulos (Tomás et al., 2010).

El mecanismo descrito en *S. cerevisiae* es diferente, este mecanismo denominado "abrazo y beso" implica que luego de la salida de los transportadores del RE, el *cis*-Golgi se aproxima y contacta con los sitios de salida del RE (ERES), provocando el colapso de la capa COPII, y permitiendo así la entrada de las proteínas al *cis*-Golgi (Kurokawa et al., 2014). Este mecanismo garantiza una eficiencia y transporte dirigido. Después de la translocación en el *cis*-Golgi, los transportadores se mueven a la red *trans*-Golgi y desde aquí se cree que las proteínas de membrana son secretadas hacia la membrana plasmática, ya sea indirectamente a través de compartimentos endosómicos o directamente en vesículas secretoras recubiertas de AP-1/clatrina, con la participación del citoesqueleto de microtúbulos (Hernández-González et al., 2018; Martzoukou et al., 2018). Para los transportadores sintetizados *de novo* las teorías actuales plantean que no seguirían las rutas convencionales dependientes del Golgi (Bouris et al., 2019; Dawicki-McKenna et al., 2012; Hesse et al., 2010; Rabouille, 2017; Takazawa et al., 2008). En este sentido se demostró recientemente (Dimou et al., 2020) que después de la salida de RE la ruta que dirige el transportador UapA sintetizado *de novo* hacia la membrana plasmática evita el Golgi, así como la necesidad de microtúbulos y endosomas. Esta ruta requiere una red de actina funcional y la clatrina (esta red es distinta a la de la ruta de tráfico convencional utilizada para la secreción polar apical relacionada con el crecimiento de hongos). Al

Introducción general

parecer, la vía convencional dependiente de los microtúbulos/Golgi opera principalmente para la clasificación de proteínas de membrana específicas que deben dirigirse de manera polar a la región apical de crecimiento activo de hongos filamentosos o a la región de gemación de las células de levadura (Arnold & Gallo, 2014; Feyder et al., 2015; Gummy & Hoogenraad, 2018; Guo et al., 2017).

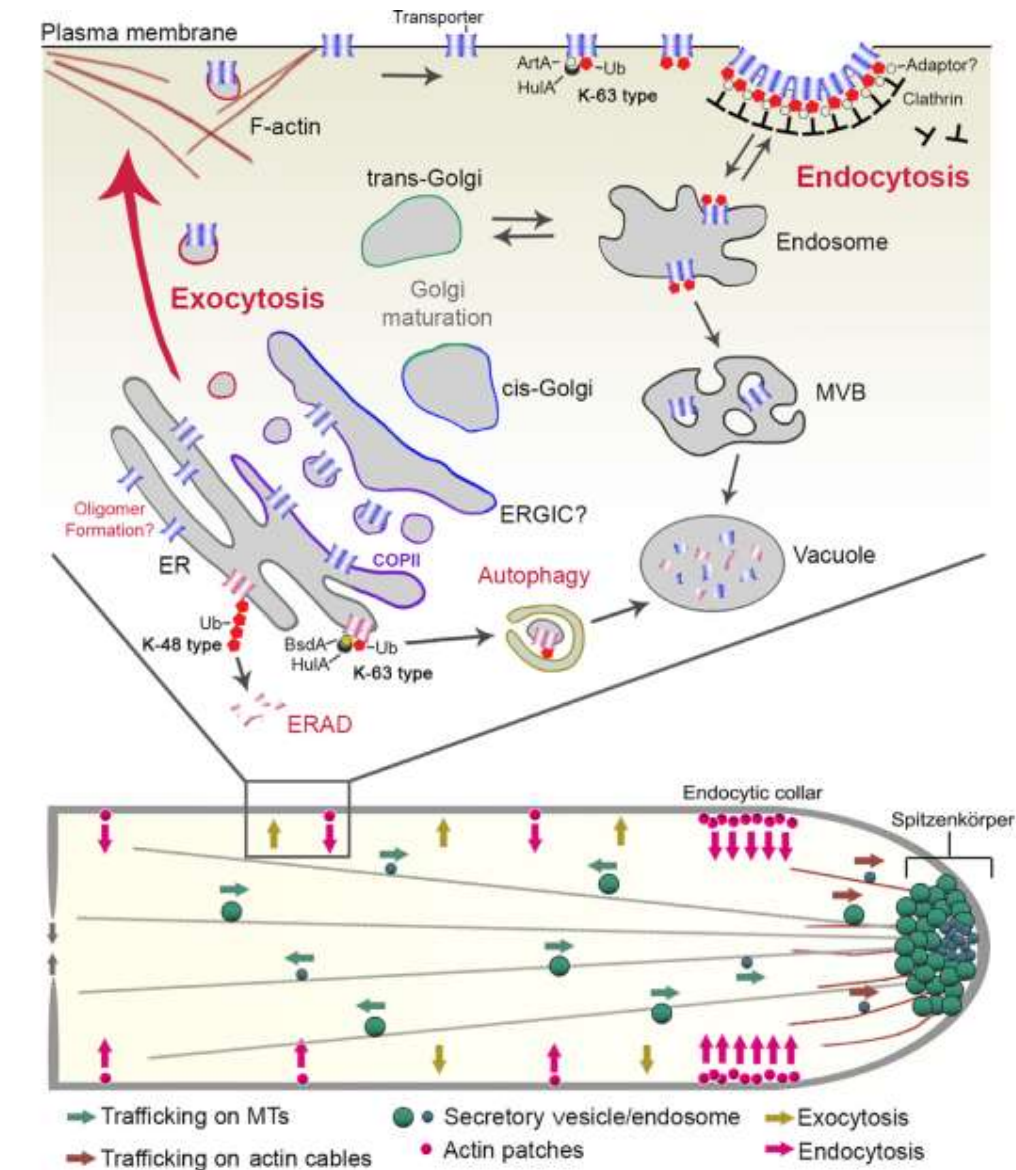


Figura 1-3: Representación esquemática de tráfico de transportadores en células de *Aspergillus*. Para mayor detalle referirse al texto. Extraído de (Mikros & Diallinas, 2019).

Así, la mayoría de los transportadores son dirigidos a la membrana plasmática embebidos en vesículas exocíticas, pero frente a determinadas condiciones los transportadores son re-dirigidos a las vacuolas para su degradación ya sea directamente a través de la vía de MVB (cuerpos multivesiculares, endosomas tardíos) o reciclados entre la membrana

Introducción general

plasmática, los endosomas y el Golgi (Figura 1-3) (Becuwe & Léon, 2014; Foley et al., 2011; Jaldin-Fincati et al., 2017; Laidlaw & MacDonald, 2018). En algunos transportadores de *S. cerevisiae* (Eising et al., 2019; MacDonald & Piper, 2017) ha sido demostrado que después de la endocitosis, estos pueden ser dirigidos nuevamente a la membrana plasmática (reciclados) en lugar de ser degradado en la vacuola. Aunque en las células de levadura, el reciclaje endocítico generalmente requiere del aparato de Golgi, también se sabe que existe una vía más directa que lo evita (Maxfield & McGraw, 2004; Wiederkehr et al., 2000). Muy poco se sabe sobre el reciclaje de transportadores en hongos filamentosos.

Este recambio proteico (endocitosis del transportador) que ocurre como mecanismo de regulación, opera a través de ubiquitinación específica mediada por ubiquitina ligasas de tipo HECT (tipo Nedd4 / Rsp5), reclutadas en los sitios de ubiquitinación por proteínas adaptadoras, conocidas como α -arrestinas (Dupré et al., 2004; Foley et al., 2011; Foot et al., 2016; Hicke & Dunn, 2003; Sorkin & von Zastrow, 2009).

La forma en que las proteínas adaptadoras reconocen secuencias o motivos estructurales y reclutan las ubiquitin-ligasas, aún es poco conocido. Las señales que conducen a la endocitosis del transportador incluyen cambios en las fuentes de carbono, nitrógeno, el pH o temperatura del medio, estrés, la presencia de algún sustrato en exceso o la presencia de fármacos que afectan la membrana u otras funciones celulares básicas (azoles, anfotericina B, rapamicina, cicloheximida, DMSO o DTT). Estas señales disparan la activación y reclutamiento de las proteínas adaptadoras que conduce a un aumento en la ubiquitinación y el recambio endocítico de los transportadores (Crapeau et al., 2014; Gournas et al., 2016; Merhi & André, 2012; Talaia et al., 2017). En particular, la ubiquitinación y el recambio endocítico también dependen de los cambios conformacionales de los propios transportadores. Se demostró que varios transportadores de *A. nidulans* y *S. cerevisiae* son más accesibles a la ubiquitinación y endocitosis cuando transportan activamente sus sustratos, un fenómeno conocido como endocitosis dependiente de sustrato (Gournas et al., 2010, 2016, 2017; Talaia et al., 2017). Esta observación apoyó la idea de que las conformaciones particulares, desencadenadas después de la unión del sustrato (por ejemplo, topologías ocluidas por sustrato o que miran hacia adentro), aumentan la accesibilidad de los adaptadores tipo arrestina (Gournas et al., 2010, 2016, 2017). En este sentido también los cambios de pH, temperatura o la composición de los lípidos de la membrana puede afectar la conformación del

Introducción general

transportador, y modificar dominios expuestos citoplasmáticamente, lo que hace que los extremos del transportador sean más accesibles para las arrestinas y el recambio endocítico (Keener & Babst, 2013; Zhao et al., 2013).

En casi todos los casos estudiados, la ubiquitinación de transportadores de hongos tiene lugar en uno o dos residuos de Lys específicos localizados en los extremos amino ó carboxilo terminal, en una región distal del STM más próximo. No se han encontrado dominios universales de unión a arrestinas pero algunos motivos relevantes tienen elementos comunes que han sido reconocidos recientemente en varios transportadores (Mikros & Diallinas, 2019). Por ejemplo, en los transportadores UapA y FurE de *A. nidulans*, se demostró que un motivo ácido corto (E/D-X-E-E) ubicado cerca del último STM y 23-25 residuos corriente arriba de los residuos de Lys modificados por ubiquitinación en el extremo carboxilo terminal son cruciales para la endocitosis mediada por arrestina (Karachaliou et al., 2013; Papadaki et al., 2019). Estos motivos señal ácidos también se describieron en *S. cerevisiae*, en el extremo amino de los transportadores de metionina y arginina y en el extremo carboxilo del transportador de monocarboxilato (Fujita et al., 2018; Guiney et al., 2016; Nikko & Pelham, 2009). Por lo tanto, parece haber un mecanismo común para el reconocimiento de transportadores por α -arrestinas probablemente basado en interacciones de la región C-terminal básica de la arrestina con los residuos ácidos presentes en las regiones citosólicas amino y/o carboxilo terminales de los transportadores. Curiosamente, en algunos casos, como en el transportador FurE de *A. nidulans* y el transportador Gap1 de *S. cerevisiae*, tanto los extremos amino como carboxilo contienen elementos necesarios para la ubiquitinación y endocitosis dependientes de arrestina (Crapeau et al., 2014; Mikros & Diallinas, 2019; Papadaki et al., 2019).

Para transportadores de *A. nidulans* se ha demostrado que esta endocitosis desde la membrana plasmática es dependiente de clatrina e independiente del complejo de proteína adaptadora AP-2. Este complejo actúa en la endocitosis de proteínas de membrana que son polarmente localizadas en la región apical en crecimiento de hifas de *Aspergillus* (Martzoukou et al., 2017).

1.3 Acercamiento a las relaciones estructura - función de un transportador

Los transportadores son proteínas complejas desde el punto de vista técnico. El bajo nivel de expresión, la naturaleza hidrófoba, el gran tamaño y la topología transmembrana de los transportadores son razones por las que, hasta hoy en día, estas proteínas no pueden ser estudiadas mediante enfoques biofísicos o estructurales en su entorno de membrana natural. El uso de detergentes durante la purificación para métodos cristalográficos u otros métodos biofísicos, o la reconstitución en proteoliposomas para ensayos funcionales, no tiene en cuenta el papel significativo de especies de lípidos específicas en el plegamiento, funcionamiento o recambio del transportador. Este problema se agrava aún más cuando se trata de transportadores eucariotas, donde los lípidos desempeñan funciones reguladoras adicionales relacionadas con el tráfico de membranas y la expresión de un transportador en la membrana plasmática (Diallinas, 2014).

La mayor parte del conocimiento sobre la función de los transportadores procede de enfoques genéticos y bioquímicos. En los últimos años, la disponibilidad de estructuras 2D y 3D obtenidas por cristalografía por rayos X y crio-EM, así como las contribuciones de enfoques computacionales y teóricos, han mejorado enormemente la comprensión de las relaciones estructura-función de los transportadores (Abramson, 2003; Abramson et al., 2004; Murakami et al., 2002).

El auge de la cristalografía de transportadores ha cambiado la visión sobre las relaciones estructura-función y el mecanismo de catálisis del transporte, pero cabe aclarar que en la mayoría de los casos los estudios estructurales demostraron estar de acuerdo con los resultados obtenidos mediante aproximaciones genéticas y bioquímicas. Los residuos que mediante análisis puramente genéticos y bioquímicos se identificaron como responsables de la unión o translocación del sustrato concuerdan con su ubicación en las estructuras cristalinas y viceversa.

La gran mayoría de los transportadores consta de 10 a 14 segmentos transmembrana α -helicoidales (TMS) conectados a través de *loops* intracelulares y extracelulares y regiones citoplasmáticas N- y C-terminales. Estos transportadores parecen funcionar como monómeros, aunque algunos también forman dímeros u oligómeros. Los transportadores más simples, de 3-6 TMS, parecen formar complejos funcionales homo o hetero-oligoméricos. Sorprendentemente, los transportadores de familias de proteínas funcional

Introducción general

y evolutivamente distintas, sin similitud de secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y diferentes especificidades de sustrato, parecen exhibir plegamientos similares (Diallinas, 2014).

La mayoría de las estructuras transportadoras conocidas se encuentran dentro de dos tipos de plegamientos; el tipo 6 + 6 de Superfamilia Facilitadora Mayor (MFS) (Abramson et al., 2004; Kaback et al., 2011; Madej et al., 2014), y el entrelazado 5 + 5 tipo LeuT / Mhp1 (Forrest et al., 2011; Penmatsa & Gouaux, 2014b; Shi, 2013; Weyand et al., 2008; Yamashita et al., 2005). 6 + 6 o 5 + 5 representan los segmentos transmembrana α helicoidales presentes en cada tipo de pliegue transportador. Una variación del tipo 5 + 5 está ejemplificada por los transportadores 7 + 7 de la familia NAT/NCS2. De hecho, varios de los transportadores 5 + 5 contienen 2 o 4 hélices adicionales, con un total de 12 o 14 STM, pero estos dominios adicionales probablemente estén involucrados en la oligomerización, el tráfico o la rotación, más que en la actividad de transporte (Lu et al., 2011; Västermark & Saier, 2014). Los plegamientos estructurales comunes que se encuentran en los simportadores, facilitadores y antiportadores sugieren fuertemente que la arquitectura proteica general no determina el modo de transporte. A pesar de las importantes diferencias estructurales, como por ejemplo el sitio principal de unión del sustrato y el mecanismo de transporte, todos los tipos comparten algunos puntos comunes, como una aparente simetría estructural interna- doble o la presencia de α -hélices de membranas discontinuas que albergan residuos involucrados en la unión del sustrato y/o la unión de iones. Esto sugiere algunos orígenes ancestrales comunes (Forrest et al., 2011; Krishnamurthy & Gouaux, 2012; Penmatsa & Gouaux, 2014b; Shi, 2013; Västermark & Saier, 2014).

El análisis de las estructuras de transportadores disponibles actualmente propone que los transportadores se pueden encontrar en una serie de conformaciones intermedias interrelacionadas y no simplemente en topologías orientadas hacia afuera o hacia adentro. El transportador recorre un conjunto de estados conformacionales definidos que proporcionan un marco estructural necesario para el transporte eficiente del sustrato. El principio de un ciclo de transporte se ilustra en la Figura 1-4.

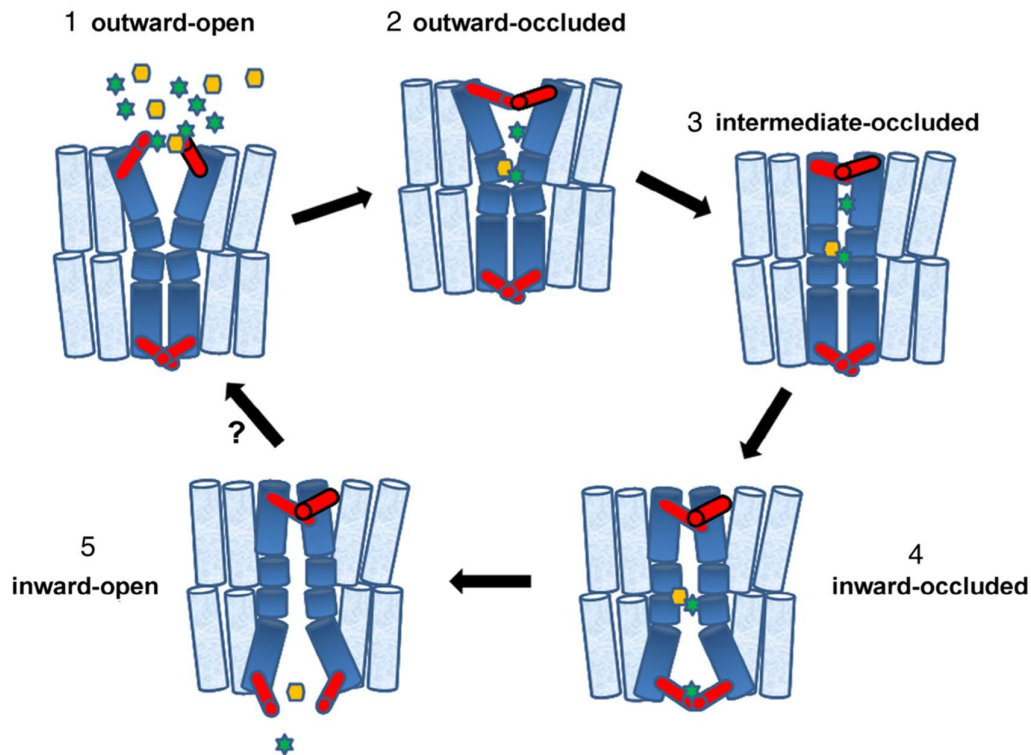


Figura 1-4: Modelo de estados conformacionales. (1) mirando hacia afuera con la compuerta extracelular abierta (compuerta citoplasmática ocluida), (2) mirando hacia afuera con la compuerta extracelular ocluida (la compuerta citoplasmática permanece ocluida), (3) intermedia con ambas compuertas ocluidas, (4) mirando hacia adentro con las compuertas ocluidas, (5) mirando hacia adentro con solo la compuerta citoplasmática abierta. Las compuertas, que se muestran en rojo, pueden estar formadas por unos pocos aminoácidos flexibles o dominios más grandes formados por partes de hélices α . A partir de la unión de Na^+ o H^+ (estrellas verdes) en la compuerta extracelular o más profundamente en el sitio principal de unión al sustrato, se estabiliza el estado abierto que mira hacia afuera, creando un sitio de unión al sustrato de alta afinidad (ubicado en el cuerpo del transportador). El sustrato (hexágono amarillo) también pueden unirse selectivamente a la compuerta extracelular. Después de la unión del sustrato y de los iones, la compuerta extracelular se cierra y este cierre promueve una transición de ajuste hacia el estado ocluido intermedio o orientado hacia adentro. Esta transición implica importantes movimientos conformacionales de hélices α flexibles o partes de hélices (mostradas en azul oscuro). En el estado orientado hacia adentro, la liberación de Na^+ o H^+ estabiliza la apertura de la compuerta intracelular y desencadena la liberación del sustrato. El transportador abierto que mira hacia adentro vacío puede entonces regresar al estado que mira hacia afuera y, por lo tanto, completar el ciclo de transporte. El diagrama muestra una transición de un solo paso de "abierto hacia adentro" a "abierto hacia afuera", mientras que esto puede requerir varios pasos intermedios. El esquema muestra un simportador, pero el mismo modelo se puede adaptar fácilmente a facilitadores y antiportadores. Extraído de (Diallinas, 2014).

El sustrato (s) se une primero al transportador vacío en la conformación que mira hacia afuera, donde el sitio de unión solo es accesible desde el lado extracelular (Figura 1-4). A esto le sigue el cierre (u oclusión) de las puertas moleculares externas para dificultar la difusión del sustrato. El cierre de la puerta se facilita por el reordenamiento (inducido por el sustrato) de cadenas laterales de un solo aminoácido o por la flexión de hélices α individuales, partes de hélices u horquillas helicoidales. Posteriormente se da un cambio

Introducción general

conformacional de la conformación ocluida (cerrada) que mira hacia afuera a la conformación ocluida que mira hacia adentro. Durante este cambio estructural, el transportador pasa a través de la forma intermedia ocluida, donde el sustrato queda inaccesible tanto al medio intracelular como extracelular. A esto le sigue la apertura de las puertas moleculares internas, lo que permite la liberación del sustrato al citosol. El ciclo de transporte se completa cuando el transportador cambia de la forma interna vacía a la conformación externa vacía, lo que permite que la proteína comience un nuevo ciclo de transporte (Diallinas, 2008b; Forrest et al., 2011; Forrest & Rudnick, 2009; Madej et al., 2012, 2014; Reyes et al., 2009).

En el caso de un antiportador, se transporta solamente el sustrato durante la conversión de la conformación ocluida orientada hacia afuera a la conformación ocluida orientada hacia adentro, mientras que el co-sustrato se transporta en la etapa de retorno desde la conformación hacia adentro hacia afuera. En resumen, la idea actual es que los transportadores funcionan a través de una cascada de alteraciones conformacionales, algunas de las cuales son “pequeñas” (apertura y cierre de la compuerta), otras más dramáticas (transición de afuera hacia adentro de la trayectoria de translocación principal).

Se han propuesto varios modelos para explicar estos mecanismos de alteración conformacional: “interruptor basculante con compuerta”, “haz oscilante”, “abrazadera e interruptor” y los mecanismos “elevadores” (Figura 1-5) (Colas et al., 2016; Diallinas, 2008b; Drew & Boudker, 2016; Penmatsa & Gouaux, 2014a; Quistgaard et al., 2016). Todos consideran la existencia de varios tipos de “elementos de *gating*” que operan alternativamente a ambos lados de los transportadores. La accesibilidad alterna se puede lograr solo a través del acoplamiento alostérico con compuerta extracelular e intracelular. La evidencia actual apoya la sugerencia de que el cierre de compuerta parece preceder a la alteración del cambio de conformación afuera-adentro.

En los modelos de “interruptor basculante con compuerta”, “abrazadera e interruptor” y “haz oscilante”, los transportadores comprenden dos dominios, en donde el sustrato se une en la interfaz (aproximadamente en la mitad de la membrana). Las transiciones entre los estados que miran hacia afuera y hacia adentro involucran movimientos de los dominios entre sí. La unión del sustrato está más asociada con reordenamientos locales de los elementos de activación. Los mecanismos de “interruptor basculante con compuerta” y de “abrazadera e interruptor” difieren del “haz oscilante” ya que los

dominios “móviles” son estructuralmente simétricos en los primeros pero asimétricos en los haces oscilantes, donde solo un dominio parece moverse. Además, existen diferencias importantes en sus eventos de activación (Colas et al., 2016; Drew & Boudker, 2016; Penmatsa & Gouaux, 2014b; Quistgaard et al., 2016).

En el mecanismo de acceso alternativo del “elevador”, el sitio de unión al sustrato está confinado a un solo dominio que atraviesa la membrana a lo largo de un armazón relativamente rígido, inmóvil o dominio de dimerización. Este dominio proporciona la mayoría de los elementos de activación y participa en la oligomerización del transportador. Los transportadores que utilizan el mecanismo “elevador” son evolutivamente distintos, lo que sugiere que este mecanismo ha evolucionado varias veces de forma independiente (Colas et al., 2016; Drew & Boudker, 2016; Penmatsa & Gouaux, 2014a; Quistgaard et al., 2016). También se ha propuesto otro mecanismo multimodal más complejo que asume múltiples sitios de unión secundarios y que abarca elementos en forma de canal (Naftalin, 2010).

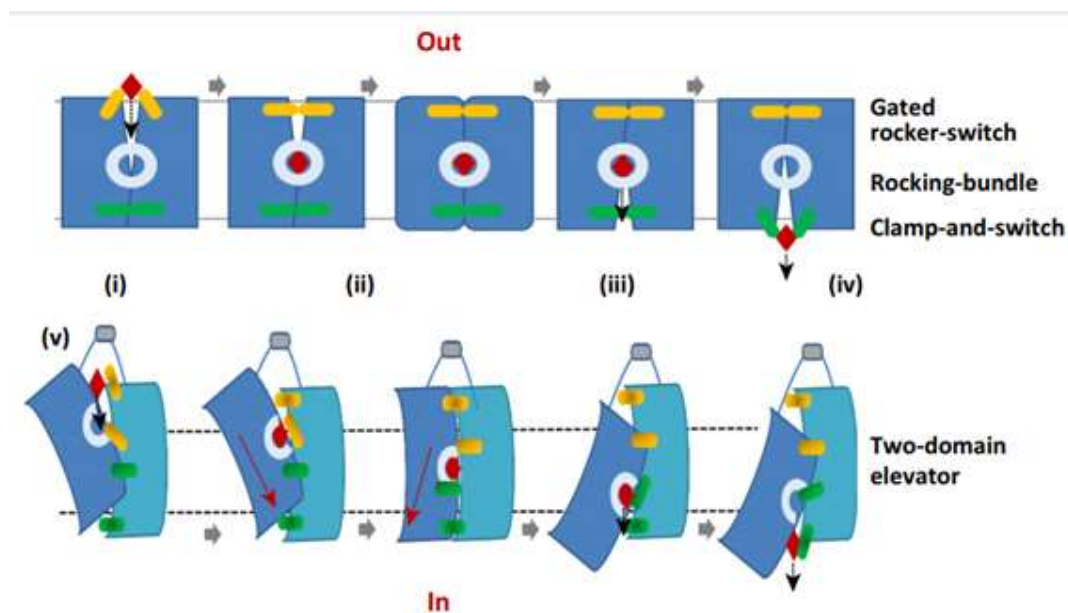


Figura 1-5: Esquema de diferentes modelos para la alternancia entre la conformación abierta y cerrada de un transportador. En el panel de arriba se representan los modelos de “interruptor basculante con compuerta”, “abrazadera e interruptor” y “haz oscilante” y en el panel de abajo el modelo de “elevador”. En rojo se representa el sustrato, en amarillo los elementos considerados externos y en verde lo elementos considerados internos. i) conformación abierta hacia afuera; ii) conformación cerrada hacia afuera; iii) conformación cerrada con el sustrato unido; iv) conformación cerrada hacia adentro; v) conformación abierta hacia adentro. Extraído de (Diallinas, 2016).

En suma, más allá de las diferencias, el “viejo mecanismo” de acceso alterno, sigue siendo válido, en sus principios básicos, para los transportadores de tipo 6 + 6 y 5 + 5/7 + 7 (Abramson et al., 2004; Forrest & Rudnick, 2009; Kaback et al., 2011; Shi, 2013). Lo que es “nuevo” en estos mecanismos de cambios de conformación es la presencia de compuertas topológicamente independientes que controlan el acceso selectivo de los sustratos al sitio principal de unión al transporte. La presencia de estas puertas selectivas se evidenciaron primero mediante la caracterización funcional de mutaciones que afectan la especificidad del transportador de purinas UapA y se confirmaron luego mediante la estructura cristalina (Alguel et al., 2016; Diallinas, 2014).

1.4 Transportadores de purinas

Las purinas son compuestos orgánicos (heterocíclico aromático) cuya estructura está compuesta por dos anillos fusionados, uno de seis átomos (pirimidina) y otro de cinco (imidazol), en total estos anillos presentan cuatro nitrógenos (Figura 1-6).

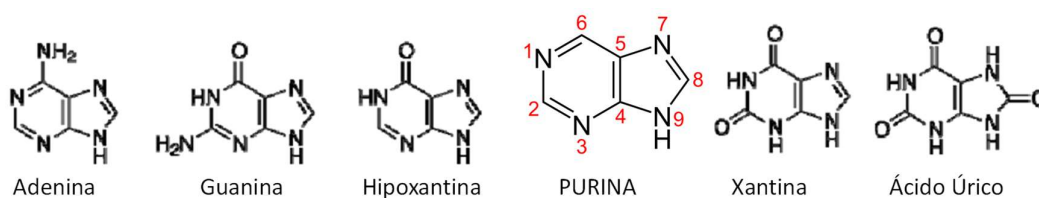


Figura 1-6: Estructura química de purinas.

Estos compuestos nitrogenados, además de ser precursoras de la biosíntesis de ácidos nucleicos participan en la señalización celular, la homeostasis, la nutrición y la respuesta al estrés y, por último, pero no menos importante, el metabolismo energético. El suministro externo de purinas puede ser vital para las células que utilizan las vías de *salvataje* para la síntesis de nucleótidos o utilizan purinas como fuentes de nitrógeno o carbono a través del catabolismo. La entrada de estos solutos está regulada por diferentes sistemas de transporte de membrana según el tipo de célula. Las células microbianas en todos los dominios poseen transportadores de bases nucleotídicas específicos, normalmente distintos de los implicados en la captación de nucleósidos (Lu et al., 2011; Lucic et al., 2008; Shimamura et al., 2010; Yamamoto et al., 2010).

Introducción general

Los hongos poseen tres familias estructural, funcional y filogenéticamente distintas de simportadores (H^+) de purinas y / o pirimidinas (Lucic et al., 2008; Pantazopoulou & Diallinas, 2007). Éstas son la familia NCS1 (*Nuceobase: Cation Symporter-1 family*), la familia NAT/NCS2 (*Nucleobase/Ascorbate transporter o Nuceobase: Cation Symporter-1 family*) y la familia *AzgA-like*. Los transportadores NCS2 están presentes en todos los principales taxones de organismos, incluidos los mamíferos, los transportadores NCS1 y los transportadores *AzgA-like* no tienen homólogos estructurales en los animales (<http://www.tcdb.org/>).

La mayor cantidad de datos sobre la función de los transportadores de bases nucleotídicas provienen de estudios genéticos y bioquímicos realizados en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. En este organismo se han caracterizado cinco genes que codifican transportadores específicos de nucleobase pertenecientes a las tres familias evolutivas, denominados *AzgA*, *UapA*, *UapC*, *FcyB* y *FurD* (<http://www.membranetransport.org/>). De hecho, la familia *AzgA-like* se ha definido a partir de la permeasa homónima de *A. nidulans* *AzgA* (Cecchetto et al., 2004).

AzgA es un transportador dependiente del gradiente H^+ de alta afinidad y alta capacidad, específico para adenina-hipoxantina-guanina y no puede reconocer las purinas oxidadas xantina y ácido úrico ni pirimidinas. También reconoce, con afinidad moderada, análogos de purina específicos, algunos de los cuales son citotóxicos, como la 8-azaguanina (Cecchetto et al., 2004; Darlington & Scazzocchio, 1967; Goudela et al., 2006). Hasta la fecha, otras proteínas de la familia *AzgA-like* con actividad verificada son las del Ascomycota *Aspergillus fumigatus* (*AfAzgA*), del Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium* (*PhZ*), de la planta *Arabidopsis thaliana* (*AtAzg1* y *AtAzg2*), de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (*BBB22* y *BBB23*) y de *Escherichia coli* (*PurP*, *YicO*, *YjcD* e *YgfQ*) (Barraco-Vega et al., 2017; Goudela et al., 2008; Jain et al., 2012; Mansfield et al., 2009; Papakostas et al., 2013).

UapA y *UapC*, son prototipos de la familia NAT/NCS2 (Darlington y Scazzocchio, 1967; Diallinas y Scazzocchio, 1989; Diallinas et al., 1995). Ambos reconocen la xantina igualmente bien, pero *UapA* también es un transportador eficiente de ácido úrico y sus análogos, mientras que *UapC* muestra una afinidad significativamente reducida por el ácido úrico y una afinidad moderada por el oxipurinol. (Koukaki et al., 2005; Kryptou & Diallinas, 2014). Hasta la fecha, se han caracterizado funcionalmente aproximadamente 20 miembros de esta familia. La mayoría de éstos son simportadores

acoplados de H⁺ (bacterias, hongos y plantas) o Na⁺ (mamíferos) específicos para la captación celular de xantina, ácido úrico o uracilo y análogos relacionados. Curiosamente, en los primates, los homólogos de NAT/NCS2 (SVCT1 y SVCT2) únicamente transportan ácido L-ascórbico (Frillingos, 2012; Goudela et al., 2008).

Respecto a la familia NCS1, FcyB, el homólogo más cercano a la permeasa de *Saccharomyces cerevisiae* Fcy2p es un transportador menor de purina (solo adenina e hipoxantina) y citosina. La proteína FurD, como Fur4p de *S. cerevisiae*, reconoce y transporta con alta afinidad y alta capacidad uracilo y 5-fluorouracilo. Por tanto, respecto a la absorción de purinas estos transportadores contribuyen muy poco (FcyB) o nada (FurD) (Amillis et al., 2007; Jund et al., 1988; Vlanti & Diallynas, 2008; Weber et al., 1990).

1.5 *Aspergillus nidulans*: Modelo para el estudio de transportadores

Emericella nidulans (*Aspergillus nidulans*) es un ascomycota ampliamente utilizado como modelo de investigación. Su genoma haploide, crecimiento rápido y requerimientos nutricionales simples son características que facilitan su utilización en el laboratorio. Desde la década de 1990 se ha utilizado como sistema modelo para el estudio de varios aspectos de la biología de los transportadores, como la regulación de la expresión, el tráfico intracelular, la relación estructura-función, la especificidad por el sustrato y la evolución molecular. En este organismo modelo se pueden utilizar herramientas simples como ensayos de captación, construcción de cepas *knockout* de múltiples genes que permiten la evaluación directa de un transportador dado en un contexto genético “limpio” que carece de otros transportadores similares, y el seguimiento subcelular *in vivo* de la expresión y el recambio del transportador mediante la fusión a proteínas fluorescentes. Estas herramientas simples, combinadas con mutagénesis racional *in vitro*, cribados genéticos aleatorios (mutaciones espontáneas o inducidas), modelado *in silico* y, más recientemente, cristalografía, han llevado a la caracterización funcional de versiones de transportadores de tipo salvaje o mutante y, finalmente, a conceptos novedosos sobre cómo funcionan los transportadores.

1.5.1 Ciclo de vida de *A. nidulans*

El ascomycota *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*) presenta un ciclo de vida compuesto por tres fases de desarrollo: asexual, sexual y parasexual (Figura 1-7).

La fase asexual muestra crecimiento vegetativo de las hifas para dar una colonia de aspecto filamentoso. Esta fase “comienza” con la germinación de una espora asexual (conidia) que da lugar a la formación de hifas tubulares que crecen de manera hiperpolarizada por extensión apical y ramificación lateral, formando una malla de hifas interconectadas denominada micelio. Una vez alcanzada la plena competencia se forman los conidióforos, donde se producen conidias uninucleadas (haploides). Esto facilita la obtención de colonias aisladas mediante siembra de conidias (diluciones sucesivas) cada una de las cuales dará lugar a una colonia. La producción masiva de conidias uninucleadas y haploides constituye una ventaja en los estudios de mutagénesis ya que permite analizar los efectos provocados por mutaciones “recesivas”. Durante el crecimiento vegetativo, pueden formarse heterocariontes por un mecanismo de anastomosis: dos hifas de cepas diferentes (diferentes núcleos), se fusionan permitiendo el intercambio de núcleos y dando lugar a una colonia con núcleos haploides diferentes entre sí. Las conidias de estos heterocariontes tendrán uno u otro núcleo.

Introducción general

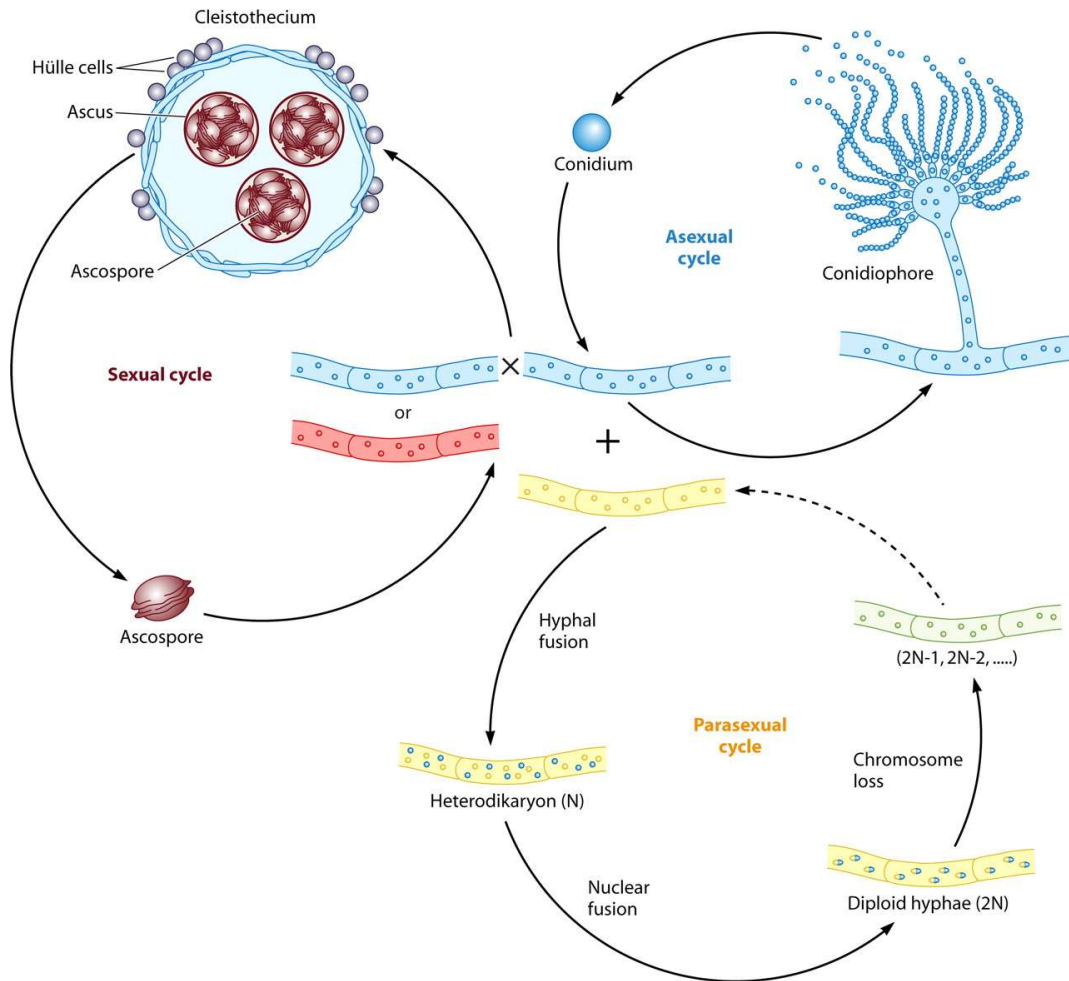


Figura 1-7: Ciclo de vida de *A. nidulans*. Extraído de (Lee et al., 2010).

En la fase de reproducción sexual se forma un cuerpo de fructificación de forma esférica llamado cleistotecio, en su interior se encuentran una gran cantidad de sacos denominados ascos, que contienen las esporas sexuales o ascosporas. El proceso de formación del cleistotecio comienza cuando dos núcleos haploides se congregan para dar lugar a la hifa ascogénica. Luego del evento de fertilización, una meiosis y dos mitosis se suceden para dar lugar a la formación del asco maduro. Los cuatro núcleos producidos por meiosis se dividen mitóticamente para generar 8 núcleos haploides que se dividen de nuevo (mitosis sin división celular) para dar lugar a 8 esporas binucleadas (haploides). Cada cleistotecio se forma a partir de un único evento de fertilización, por lo que en las ascosporas se segregan los caracteres parentales. *A. nidulans* es homotálico por lo que todos los pasos del ciclo sexual pueden ocurrir en un solo micelio sin necesidad de un “compañero sexual”, esto permite que una única cepa pase por un ciclo de automeiosis. Por otro lado, si dos cepas de *A. nidulans* entran en contacto, se anastomosarán fácilmente y formarán

filamentos heterocarióticos. Durante el ciclo sexual, la fusión puede tener lugar entre dos núcleos diferentes (cleistotecio cruzado) o entre dos núcleos de un mismo progenitor. La proporción de cleistotecios cruzados varía según las cepas. La utilización de cepas con auxotrofías complementarias aumenta la proporción de cleistotecios provenientes de la fecundación de núcleos distintos.

Este organismo también tiene un ciclo parasexual con alternancia de fases haploides y diploides. El micelio heterocariótico puede dar lugar espontáneamente a una espora diploide, el micelio diploide crece como la cepa haploide, pero no es una forma estable y vuelve fácilmente al estado haploide. El proceso de haploidización se inicia con el diploide que durante la formación de nuevas conidias segrega cromosomas y termina con la formación de haploides recombinantes. Esta fase, permite asignar genes a los distintos cromosomas usando mutaciones e identificar translocaciones (Käfer, 1958; Pontecorvo et al., 1953).

1.5.2 Ensayos de transporte

Los ensayos de captación (“*uptakes*”) permiten el análisis cinético directo de un transportador específico midiendo la afinidad de sustrato (K_m aparentes) y capacidad de transporte (V_m aparente). También permiten la caracterización de perfiles de sustratos mediante ensayos de competición. Estos ensayos se pueden realizar fácilmente utilizando sustratos radiomarcados en microorganismos unicelulares, principalmente bacterias y levaduras, pero también protozoos, algas o con tipos específicos de células animales tales como ovocitos de *Xenopus* o eritrocitos, que se puede cultivar como suspensiones celulares homogéneas (Desai, 2012; Sigel, 1990; Thomas et al., 2011). En organismos multicelulares como los hongos filamentosos presentan algunas dificultades técnicas. En *A. nidulans*, los problemas asociados con el desarrollo del micelio y la diferenciación celular se resolvieron mediante el uso de conidiosporas recolectadas en la fase isotrópica de germinación (antes de la emergencia del tubo germinativo). En esta etapa de desarrollo, la mayoría de los transportadores analizados hasta ahora están altamente expresados a través de la transcripción *de novo* independientemente de las condiciones fisiológicas impuestas. Las conidiosporas de *A. nidulans* se asemejan a las células de levadura unicelulares, las actividades se pueden expresar por número de conidiosporas vivas, en lugar de masa seca (Amillis et al., 2004; Kryptou & Dhalluin, 2014; Tazebay et al., 1997).

Introducción general

Debido a que los transportadores tienen un sitio principal de unión al sustrato que en cada ciclo de transporte interacciona específicamente con una única molécula de sustrato (similar a enzimas), el transporte puede ser analizado mediante cinética de Michaelis-Menten y determinar los parámetros K_m y V_m . La constante K_m da una idea de la afinidad del transportador por su sustrato, cuanto mayor es K_m menor es la afinidad. La V_m aparente refleja el número de moléculas transportadoras funcionales presentes en una membrana y, por tanto, depende del nivel de expresión y recambio del transportador, que a su vez depende de las condiciones fisiológicas utilizadas para hacer crecer las células analizadas. La capacidad de transporte es la velocidad o eficiencia mediante la cual un transportador cataliza el transporte de un sustrato expresado por el valor de V_m aparente medido; en otras palabras, es la concentración de sustrato acumulada dentro de un número específico de células en un período de tiempo específico (corto).

En células vivas, un transportador dado generalmente se estudia en presencia de otros transportadores con funciones superpuestas, por lo que la cinética de transporte aparente y los perfiles de sustratos observados podrían representar resultados de varios transportadores. A pesar de esta aparente desventaja, los ensayos de transporte en células vivas son la forma más rigurosa y sencilla de determinar las características fisiológicas de un transportador (Kryptou & Diallinas, 2014).

1.5.3 Contexto genético

Los hongos poseen una multitud de transportadores de especificidades superpuestas y diferentes características cinéticas. Caracterizar un determinado transportador en este contexto tiene limitaciones ya que no es posible asignar rigurosamente las características cinéticas y especificidad de sustrato de un único transportador si en la célula en estudio están funcionando en paralelo otros transportadores similares. La posibilidad de generar mutantes nulos (pérdida de función) de éstos facilita la generación de un contexto genético "limpio", donde el único transportador funcional sea el que está en estudio.

Los transportadores de purinas de *A. nidulans* son un sistema modelo en este sentido. *A. nidulans* es el organismo donde se ha estudiado en mayor detalle tanto el catabolismo como el sistema de captación de purinas. Todos los genes estructurales y reguladores involucrados incluyendo los cinco genes que codifican para las permeasas de purinas (*uapA*, *uapC*, *azgA*, *fcyB* y *furD*) han sido estudiados (ver sección 1.4). Las herramientas genéticas y moleculares desarrolladas en este organismo y posteriormente la

Introducción general

disponibilidad de su secuencia genómica, han permitido, a través de la modificación y cruzamiento de cepas, la construcción de múltiples cepas que contienen diferentes combinaciones de estos transportadores (algunos funcionales y otros deletados o inactivados). Generando este contexto genético "limpio" se han caracterizado funcionalmente cada uno de estos transportadores (Amillis et al., 2004; Cecchetto et al., 2004; Vlanti & Diallinas, 2008). También, utilizando cepas que carecen de los tres transportadores de purinas principales (UapA, UapC y AzgA) se han podido caracterizar funcionalmente transportadores de otros organismos: AfUapC y AfAzgA de *Aspergillus fumigatus*, (Goudela et al., 2008), AbUapC y AbUapD de *Aspergillus brasilienses* (Krypotou, Scazzocchio, et al., 2015); PhU y PhZ del Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium* (Barraco-Vega et al., 2017) y LPE1 de la planta de maíz (Argyrou et al., 2001).

Por tanto, en principio, este sistema se podría utilizar para expresar y caracterizar funcionalmente cualquier transportador relacionado de cualquier organismo eucariota, si el transportador puede plegarse y dirigirse correctamente a la membrana plasmática.

1.5.4 Seguimiento *in vivo* mediante marcado fluorescente

Desde 1999, el marcado con la proteína verde fluorescente (GFP) se ha convertido en una herramienta estándar para seguir *in vivo* la expresión subcelular (y por ende el tráfico intracelular) de las versiones de tipo salvaje y mutante de los transportadores de hongos. Los transportadores normalmente se etiquetan en el extremo C-terminal, ya que la región N-terminal es fundamental para la translocación cotraduccional adecuada en la membrana del retículo endoplasmático. Los transportadores marcados con GFP que alcanzan la membrana plasmática marcan de forma homogénea la periferia de las hifas y pueden observarse en los septos. Los resultados de un análisis de 20 transportadores de hongos diferentes muestran que no existe una forma *a priori* de predecir si marcar un transportador afectará su localización o función. Por ejemplo, en los transportadores de purinas de *A. nidulans* (AzgA, UapA y UapC) el marcado con GFP es absolutamente "silencioso" con respecto a la función del transportador (Pantazopoulou et al., 2007; Valdez-Taubas et al., 2000), mientras que en otros como el transportador de prolina (PrnB) el marcado afecta la cinética de transporte. En este caso como en otros similares la adición de un *linker* de aminoácidos entre el transportador y la GFP puede resolver o

minimizar los problemas de funcionalidad (Tavoularis et al., 2001). Es importante destacar que los sistemas fúngicos permiten probar la funcionalidad de cualquier transportador etiquetado con GFP mediante la comparación de los valores de afinidad del sustrato (K_m) y los perfiles de especificidad de los transportadores etiquetados y no etiquetados. El etiquetado de GFP también proporciona una herramienta valiosa para clasificar las mutaciones del transportador en dos clases principales: las que afectan expresión subcelular, estabilidad y localización en la membrana y las críticas para la actividad de transporte propiamente. Esta fusión también es útil para determinar, por *western blot*, si la síntesis/estabilidad del transportador se ve afectada por las mutaciones generadas.

1.5.5 Vía de degradación de purinas

Como resultado de la vía de degradación de las purinas se obtiene un compuesto que varía según el organismo. En *A. nidulans* al igual que en numerosos microorganismos el producto final es amonio que puede ser utilizado como fuente de nitrógeno. De esta forma *A. nidulans* puede usar las purinas naturales (adenina, guanina, hipoxantina, xantina, ácido úrico) y sus metabolitos (alantoína, ácido alantóico y urea) como fuente de nitrógeno pero no de carbono. La vía de degradación de las purinas de *A. nidulans* (Figura 1-8) es una de las vías metabólicas mejor caracterizadas desde el punto de vista genético, fisiológico y molecular (Darlington & Scazzocchio, 1967; Gournas et al., 2011; Scazzocchio, 1994; Scazzocchio & Darlington, 1968).

Introducción general

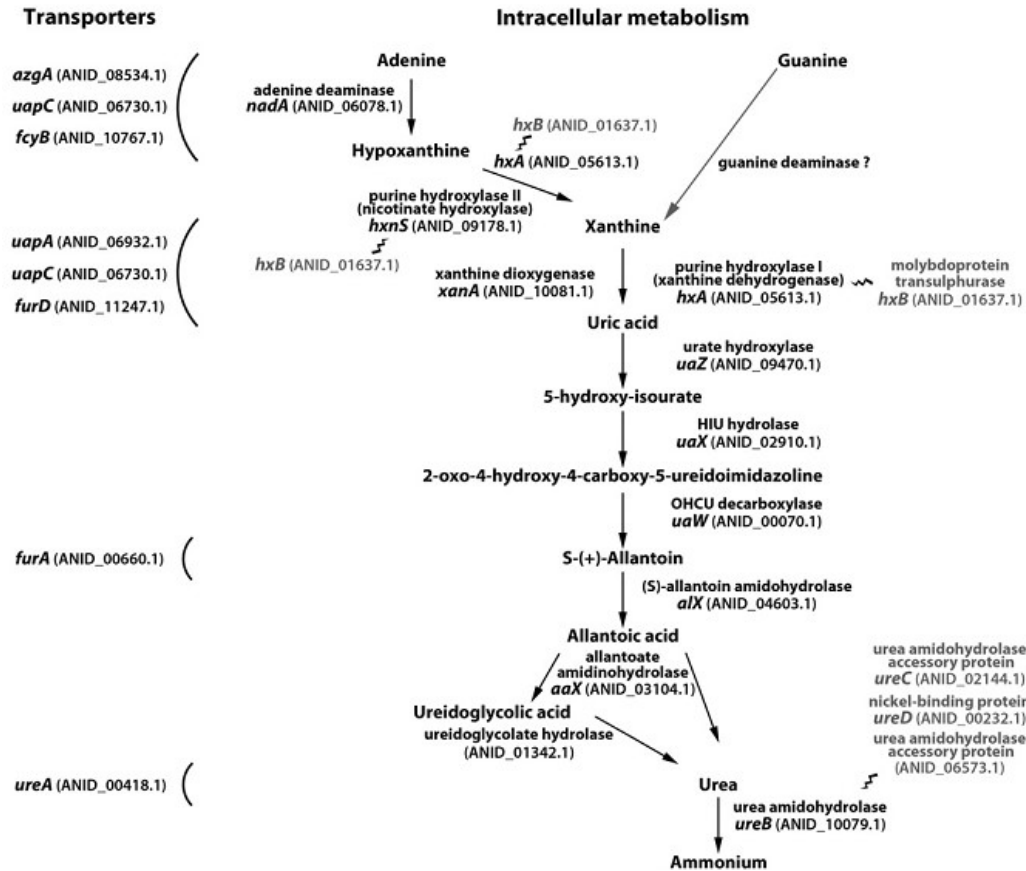


Figura 1-8: Vía de degradación de las purinas en *A. nidulans*. Sobre la izquierda se indican los transportadores involucrados en la captación de cada uno de los metabolitos. En gris se indican los genes involucrados en la síntesis de cofactores o modificaciones. La actividad de guanina desaminasa carece de sustento experimental. Extraído de Gournas et al., 2011.

La adenina desaminasa, codificada por el gen *nadA* cataliza la hidrólisis de adenina en hipoxantina y amonio (Ribard et al., 2003). La hidrólisis de hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico la realiza la enzima codificada por el gen *hxA* (Glatigny & Scazzocchio, 1995; Scazzocchio & Darlington, 1968), llamada xantina deshidrogenasa o purina hidroxilasa I. La purina hidroxilasa II, codificada por el gen *hxnS* forma parte del metabolismo del nicotinato y también puede convertir la hipoxantina en xantina pero no actúa sobre la xantina (N. J. Lewis et al., 1978). Ambas purinas hidroxilasas necesitan de un cofactor codificado por *hxB* (Amrani et al., 1999). La conversión de xantina en ácido úrico también es posible a través de una vía alternativa en la cual actúa la enzima codificada por el gen *xanA* (Cultrone et al., 2007). La oxidación de ácido úrico a alantoína ópticamente activa está a cargo de tres enzimas: la urato oxidasa codificada por el gen *uaZ* (Oestreicher et al., 1993; Oestreicher & Scazzocchio, 1993), la HIU hidrolasa codificada por el gen *uaX* y la OHCU descarboxilasa codificada por el gen *uaW* (Gournas et al., 2011). La conversión de alantoína en urea involucra la acción de tres enzimas, la

alantoinasa, la alantoicasa y la ureidoglicolasa. La primera, codificada por el gen *alX* convierte la alantoína en ácido alantoico. La segunda, codificada por el gen *aaX* es la enzima responsable de catalizar la conversión de ácido alantoico en urea o en ureidoglicolato, el cual puede ser convertido en urea mediante la ureidoglicolasa. Por último, la conversión de urea en amonio y dióxido de carbono, es catalizada por la enzima ureasa (Mackay & Pateman, 1982; Scazzocchio & Darlington, 1968).

1.6 Regulación transcripcional de los transportadores de fuentes nitrogenadas

Los hongos pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono y / o nitrógeno. Una regulación coordinada del metabolismo del carbono y nitrógeno es crucial para una rápida adaptación de su fisiología en respuesta a la calidad y concentración de los nutrientes disponibles. Generalmente, estos procesos catabólicos están bajo el control de dos sistemas reguladores globales principales, la represión catabólica por carbono y la represión metabólica por nitrógeno, además de la inducción específica de la vía en cuestión. Estos sistemas regulatorios son responsables de una utilización preferencial de la fuente energéticamente más económica de carbono o nitrógeno disponible, lo que permite que los hongos optimicen la utilización de una amplia variedad de compuestos (Chudzicka-Ormaniec et al., 2019; Wong et al., 2008).

Variedad de compuestos pueden ser usados como fuente de nitrógeno por los hongos siendo capaces de expresar las enzimas necesarias para poder llevar a cabo su catabolismo. El amonio y la glutamina son los compuestos preferidos por los hongos pero cuando estas fuentes de nitrógeno primarias no están disponibles o están presentes en una concentración tan baja que limita el crecimiento, compuestos como nitrato, nitrito, purinas, amidas, aminoácidos y proteínas pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno alternativa. La utilización de estas fuentes secundarias está altamente regulada y casi todas requieren la síntesis de las enzimas catabólicas específicas y de las permeasas en cuestión. Su utilización normalmente implica la inducción de genes, que no se activan en presencia de fuentes preferenciales (represión catabólica por nitrógeno). La síntesis *de novo* de permeasas y enzimas catabólicas de una vía particular está controlada transcripcionalmente y usualmente requiere de dos señales positivas distintas: una señal indicadora global de desrepresión del catabolismo del nitrógeno (también llamada

Introducción general

represión por amonio) y una inducción o activación de aquellos genes que intervienen en una ruta particular debido a la presencia de un sustrato o intermediario específico de la misma. Estos dos requerimientos permiten la expresión selectiva de la enzima que interviene en una ruta catabólica cuando su sustrato está presente y no hay una fuente primaria disponible. Sin embargo otros sistemas, están controlados únicamente por una señal de desrepresión global sin tener en cuenta ningún tipo de inducción (Arst & Cove, 1973) (Morozov et al., 2001).

En *A. nidulans*, la represión del metabolismo del nitrógeno está mediada principalmente por el factor GATA, AreA (Kudla et al., 1990; Ravagnani et al., 1997). AreA actúa como activador transcripcional mediante la remodelación de cromatina, aumenta la acetilación de histonas y estimula directamente la unión de activadores transcripcionales específicos (Berger et al., 2006, 2008; Muro-Pastor et al., 1999).

La actividad de AreA está modulada por mecanismos postranscripcionales y postraduccionales, en respuesta a la fuente y disponibilidad de nitrógeno. La estabilidad del transcripto *areA* refleja los niveles intracelulares de glutamina, lo que resulta en inestabilidad y bajos niveles del factor de transcripción en condiciones de suficiencia de nitrógeno. Esta señalización está mediada por la proteína RrmA, que regula la tasa de desadenilación del transcripto *areA* (Krol et al., 2013; Morozov et al., 2000, 2001; Platt et al., 1996). La actividad de AreA también está regulada a nivel de proteínas por un co-represor, NmrA, y un co-activador TamA. En la presencia de amonio o glutamina NmrA interactúa con el dedo de zinc y el extremo carboxilo terminal altamente conservado de AreA, reprimiendo su actividad (Andrianopoulos et al., 1998; Kotaka et al., 2008; Lamb et al., 2004; Platt et al., 1996). TamA interactúa con la misma parte de AreA y coactiva la expresión de genes diana (Downes et al., 2014; Small et al., 1999, 2001). La transcripción de *nmrA* está parcialmente regulada por el factor de transcripción bZIP (MeaB). MeaB y AreA coordinadamente median la represión metabólica del nitrógeno, aunque también pueden funcionar de forma independiente (Polley & Caddick, 1996; Wagner et al., 2010; Wong et al., 2007).

AreA está uniformemente distribuido en la célula, excepto bajo carencia de nitrógeno, cuando se acumula en el núcleo. Cuando se agrega una fuente primaria de nitrógeno al medio de crecimiento AreA sale del núcleo, y esto está mediado por múltiples señales de localización nuclear (Hunter et al., 2014; Todd et al., 2005). AreB es el segundo factor GATA que participa en la represión del metabolismo del nitrógeno en *A. nidulans*. Este

Introducción general

factor contiene un dominio N-terminal de unión a ADN de tipo GATA y un dominio de dimerización de cremallera de leucina C-terminal (Conlon et al., 2001; Tollervey & Arst, 1982).

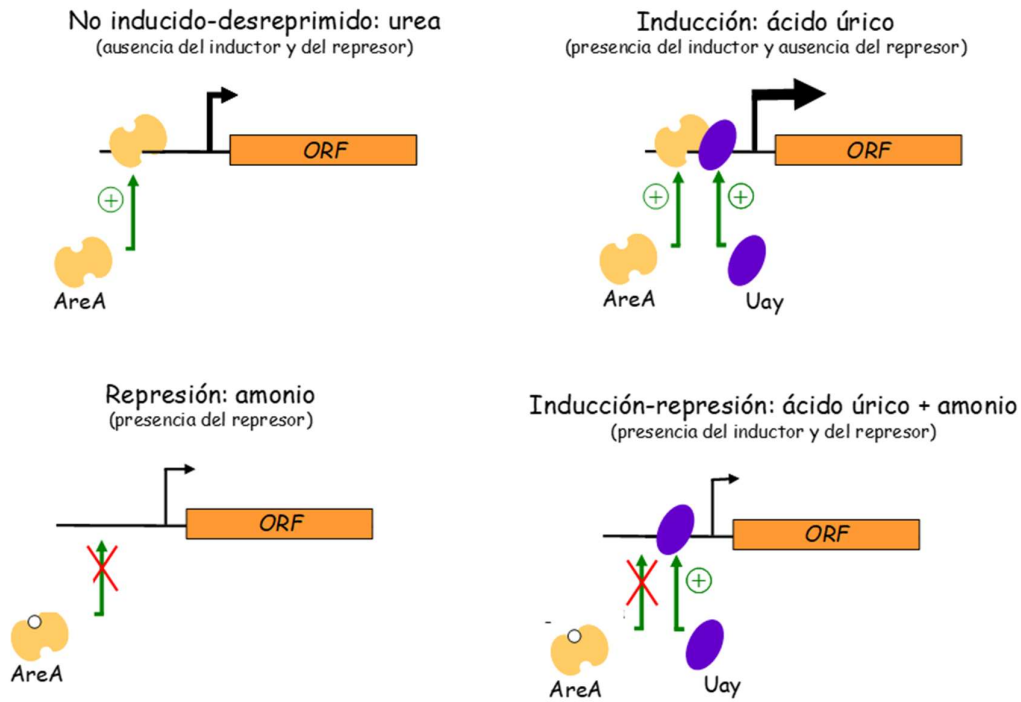


Figura 1-9: Esquema regulación transcripcional de transportadores de purinas. Extraído de Richero, 2010.

La expresión de los transportadores de solutos que se utilizan como fuente de nitrógeno o carbono es un blanco primario de los circuitos de control transcripcional. Un excelente ejemplo de este tipo de regulación lo constituyen los tres transportadores de purinas de *A. nidulans*. La expresión de los genes *azgA*, *uapA* y *uapC* está regulada a nivel de la transcripción en respuesta a una represión metabólica por nitrógeno y a la inducción específica por purinas. El mismo mecanismo regula la expresión de la mayor parte de los genes que codifican las enzimas involucradas en el catabolismo de las purinas (Scazzocchio, 1994; Scazzocchio et al., 1982). En ausencia de un inductor (ácido úrico, otras purinas) y en presencia de una fuente de nitrógeno no represora (urea, prolina), *azgA*, *uapA* y *uapC* se transcriben a un nivel basal (bajo). Frente a inducción por purinas la acumulación de ARNm de *azgA*, *uapA* y *uapC* aumenta en el entorno de siete, quince y tres veces respectivamente (Amillis et al., 2004; Cecchetto et al., 2004). La presencia de

amonio o glutamina reprime la expresión de las tres permeasas a través de AreA independientemente de la presencia de un inductor (Figura 1-9).

Debido a la expresión basal de la vía del catabolismo de purinas, la presencia de cualquier purina deriva en ácido úrico, que es el inductor de la mayoría de los genes de la vía. Esta inducción es mediada por UaY, activador transcripcional (de regulación positiva) que se expresa constitutivamente. Al igual que muchos activadores transcripcionales identificados en hongos, UaY pertenece a una familia de proteínas que se caracterizan por presentar en el extremo amino terminal un motivo de unión al ADN del tipo complejo binuclear de zinc, uniéndose a los promotores como dímero (Cecchetto et al., 2012; Scazzocchio, 1994; Suárez et al., 1995).

1.7 UapA: un transportador modelo

Uno de los primeros transportadores eucariotas analizados mediante “genética inversa” para el entendimiento de la relación entre estructura y función fue la permeasa de ácido úrico de *A. nidulans*, UapA. Se han generado más de 100 mutaciones que han sido analizadas funcionalmente y han permitido determinar cuáles son los aminoácidos críticos para su función (Diallinas, 2014; Diallinas & Gournas, 2008; Gournas et al., 2008). En el 2016 se publicó la estructura cristalográfica de esta proteína, pero previo a esto numerosos trabajos permitieron no solo identificar los residuos críticos para la unión del sustrato y el transporte del mismo sino también encontrar residuos implicados en la especificidad del transportador (Alguel et al., 2016; Kosti et al., 2012; Papageorgiou et al., 2008). Un trabajo fundamental en este sentido fue el realizado por Diallinas y colaboradores a fines de los noventa. Construyeron transportadores quiméricos UapA-UapC y UapC-UapA y determinaron que todas las quimeras que contienen una parte central de 70 aminoácidos de UapA o UapC funcionaron como UapA o UapC, respectivamente (Diallinas et al., 1998). De esta forma se pudo concluir que este segmento central, que ahora sabemos que contiene los STM8, STM9 y la primera parte de STM10 (Alguel et al., 2016), alberga el sitio de unión al sustrato. Además, la primera parte de STM10 contiene un motivo de firma característico conservado en todas las proteínas similares a UapA/C (Koukaki et al., 2005), que en ese momento ya definían la familia NAT/NCS2 (Diallinas & Gournas, 2008; Gournas et al., 2008). Posteriormente, mediante análisis mutacionales racionales relacionados en su mayoría con residuos conservados o parcialmente conservados en STM8-STM10, STM1 y STM3; se

Introducción general

identificaron 11 residuos críticos para la función: Gln85 e His86 en el STM1; Ser154 en el STM3; Glu356 y Asp360 en el STM8; Asp388 en el STM9; y Gln408, Asn409, Gly411, Thr416 y Arg417 en el STM10 (Figura 1-10).

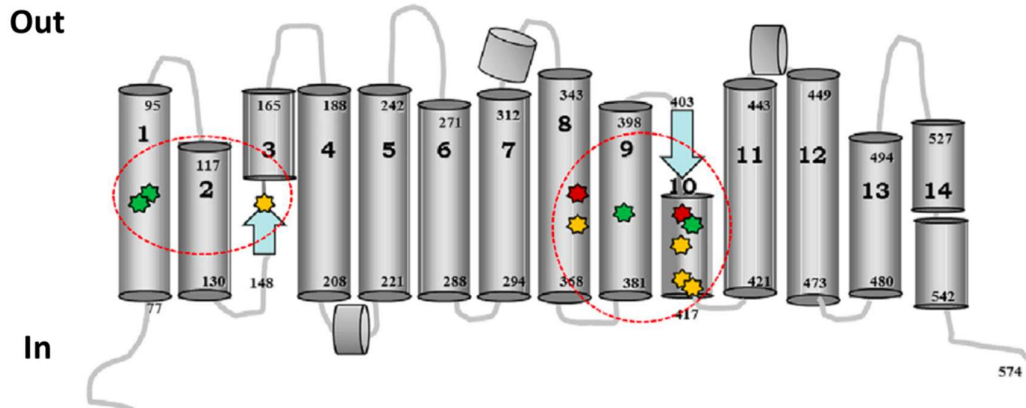


Figura 1-10: Residuos críticos del transportador UapA. En el esquema se marcan en rojo y amarillo los residuos implicados en la interacción con el sustrato, los críticos para la unión en rojo. En verde los implicados en la velocidad de transporte que no afectan las afinidades de unión a sustratos. Todas las mutaciones funcionales se encuentran en los STM1, STM3, STM8, STM9 y STM10. Las flechas representan hojas beta, los cilindros alfa hélices, los segmentos transmembrana aparecen numerados. Extraído de (Diallinas, 2016).

Mutaciones en cuatro de estos residuos (Gln85, Asp360, Asp388 y Asn409) afectan las tasas de transporte del sustrato (V_m aparente) mientras que cambios en Glu356 y Gln408, afectan la K_m de UapA para todos los sustratos. Todos los mutantes funcionalmente interesantes también se analizaron por su capacidad para reconocer un gran conjunto de análogos de purinas y pirimidinas y se compararon con UapA salvaje (Amillis et al., 2007; Goudela et al., 2005; Papageorgiou et al., 2008; Vlanti et al., 2006). Esto confirmó que el sitio de unión al sustrato de UapA comprende residuos específicos en los STM3, STM8 y STM10 y condujo a un modelo de estructura-actividad en el cual Gln408 y Glu356 se unen directamente a sustratos a través de interacciones de enlace H con el N1, C2=O, N7, o N9 del anillo de purina (Figura 1-11). El análisis mutacional de las proteínas NAT de *E. coli* homólogas condujo a conclusiones casi idénticas con respecto a las funciones de los residuos implicados en la unión y el transporte del sustrato (Frillingos, 2012; Georgopoulou et al., 2010; Karatza et al., 2006; Karna & Frillingos, 2009, 2011; Mermelekas et al., 2010).

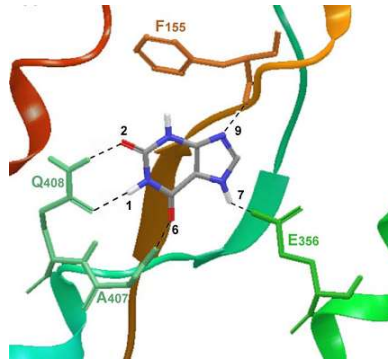


Figura 1-11: Interacciones UapA-sustrato. Representación esquemática de interacción xantina-UapA. Extraído de (Kosti et al., 2012).

Es importante destacar que el modelo 3D de UapA publicado en 2011 construido en base al transportador de uracilo de *E. coli*, UraA (primera proteína NAT cristalizada)(Lu et al., 2011), apoyó plenamente las predicciones genéticas relativas a los residuos involucrados en la unión y transporte del sustrato y confirmó que los residuos críticos para la especificidad se localizan fuera del sitio de unión al sustrato (Kosti et al., 2012).

Si bien el análisis mutacional racional sistemático de UapA llevó a la identificación del sitio putativo de unión al sustrato, dejó abierta la forma en cómo se determinaba la especificidad del mismo por el ácido úrico y la xantina, ya que ninguna mutación analizada conducía a una versión de UapA capaz de transportar otras purinas. Los mutantes que respondieron esta pregunta fueron obtenidos utilizando cribados genéticos de cepas que expresaban UapA (salvaje o mutantes seleccionadas) pero que carecían de los transportadores principales de otras purinas y se seleccionaron colonias que podían crecer en hipoxantina o adenina (Amillis et al., 2001; Kosti et al., 2010; Papageorgiou et al., 2008). De esta forma se identificaron varios residuos que, al mutarse, convierten a UapA en una proteína capaz de transportar todas las purinas. Sorprendentemente, casi todas las mutaciones de especificidad obtenidas se localizaron fuera del sitio de unión al sustrato propuesto (STM1, STM3 o STM8-STM10) ubicándose dentro del *loop* extracelular que une STM1/2 (Gln113), STM11 (Ala441), STM12 (Val463, Ala469) y, con mayor frecuencia, STM13 (Arg481) y STM14 (Thr526 y Phe528) (Figura 1-12). Una única excepción fue la mutación F406Y, que afectó a un residuo dentro del sitio de unión al sustrato (Kosti et al., 2010). Todas estas mutaciones mostraron una capacidad de transporte relativamente alta, pero una afinidad de unión extremadamente baja por sustratos "nuevos" como hipoxantina, adenina o uracilo, y conservaron características de transporte a nivel del salvaje para los sustratos fisiológicos ácido úrico y xantina. Además,

Introducción general

como el sitio de unión de estos mutantes no se vio afectado se apoyó la idea de que las mutaciones de especificidad debían definir otros dominios que actuaban como "filtros moleculares" o elementos de "compuerta". Además, dado que algunas de las mutaciones de especificidad obtenidas con mayor frecuencia se referían a residuos ubicados tanto hacia el lado extracelular (como Thr526) como citoplásmico (como Arg481) de los STM, se concluyó que los filtros o compuertas debían estar presentes en ambos lados de los principales sitios de unión al sustrato (Kosti et al., 2010; Papageorgiou et al., 2008).

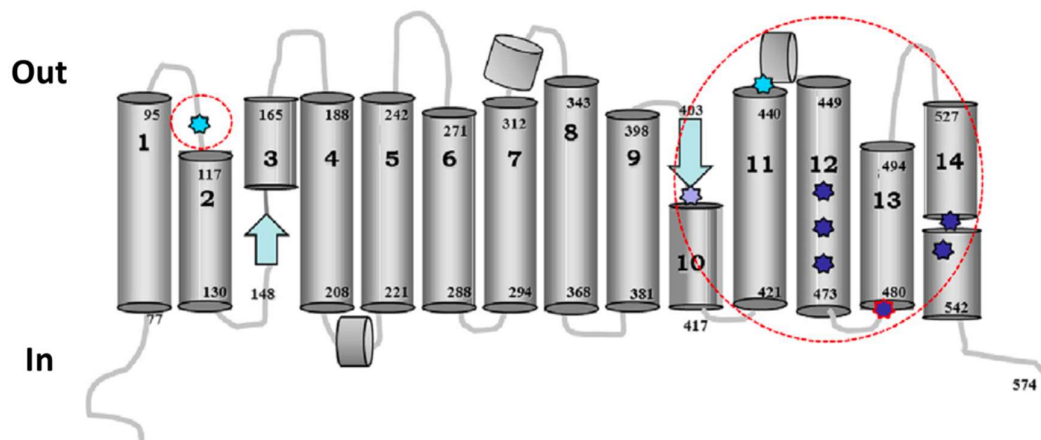


Figura 1-12: Residuos críticos para la especificidad del sustrato. En el esquema se marca en azul los elementos de compuerta ubicados dentro de los segmentos transmembrana STM12, STM13 y STM14, mientras que en turquesa se representan los elementos de compuerta en las bisagras flexibles STM1-STM2 y STM11-STM12. Extraído de (Diallinas, 2016).

La existencia de estos dominios "compuerta" comenzó a hacerse evidente cuando diferentes transportadores se cristalizaron en conformaciones orientadas hacia afuera o hacia el citoplasma en estados "ocluídos" o "abiertos"; es decir, en estados donde una compuerta está cerrada o abierta. Desde entonces, se han cristalizado decenas de estructuras transportadoras y se ha demostrado que existen en estados abiertos u ocluidos, lo que ayuda a definir la dinámica de las alteraciones de las diferentes conformaciones (Diallinas, 2016).

La expresión y purificación de cantidades suficientes de UapA para ser cristalizada se logró en cepas de *S. cerevisiae* que carecen de peptidasas vacuolares (Leung et al., 2010). Ensayos de microscopía de epifluorescencia revelaron que la proteína UapA marcada con GFP se localizaba predominantemente en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* y los ensayos de captación confirmaron que estaba completamente activo. Sin embargo, la proteína purificada era extremadamente inestable frente a los intentos de cristalización.

Introducción general

El cribado de varios mutantes de UapA, que parecían más estables teniendo en cuenta la reducción de la actividad de transporte y el aumento de la fluorescencia de GFP en la membrana plasmática, condujo a la identificación del mutante G411V, que es significativamente más estable (especialmente en presencia de xantina). La cristalización de UapA se logró mediante una versión de la proteína que incluye esta mutación y además esta truncada en el N-terminal (G411V Δ 1-11), y aunque no es capaz de transportar xantina resultó ser excelente para la cristalización (Alguel et al., 2016; Leung et al., 2013).

Con la estructura cristalina se definió que UapA tiene dos dominios clave, un dominio central compacto (STM1–4, STM8–11) que contiene el sitio de unión al sustrato y, un dominio de puerta (STMS–7 y STM12–14) que alberga la mayoría de los residuos que afectan la especificidad. En los cristales, la proteína se encuentra en forma de dímero que se forma exclusivamente a través de interacciones del dominio puerta (Alguel et al., 2016). Por otra parte, el cristal proteína-sustrato también confirmó la orientación de la xantina dentro del sitio de unión de UapA y sus interacciones con residuos específicos previamente predichas mediante enfoques genéticos, bioquímicos e *in silico* (Kosti et al., 2012). Un punto sumamente interesante fue la reevaluación de todas las mutaciones/residuos de especificidad a la luz de la estructura cristalina. La topología de casi todos los residuos que afectan la especificidad (excepto Arg481) apoyó el mecanismo propuesto de tipo elevador de transporte de dos dominios. Estos residuos podrían clasificarse en tres tipos: los ubicados dentro o muy cerca del sitio de unión (Phe155 y Phe406 en los STM3 y STM10, respectivamente); los que se encuentran en la interfaz del dominio central y el dominio puerta, sobre (Thr526 y Phe528 en el STM14) o debajo (Val463 y Ala469 en el STM12) del sitio de unión al sustrato; y residuos ubicados en regiones de bisagra flexibles que afectan el movimiento relativo de los dominios de núcleo y puerta (Gln113 en STM1/2 y Ala441 en STM11) (Figura 1-13). En otras palabras, la especificidad podría verse afectada por la modificación del sitio de unión al sustrato en sí (tipo I), por elementos que actúan como filtros específicos a lo largo de la trayectoria de translocación del sustrato formada entre los dominios de puerta y núcleo (tipo II), o por mutaciones en 'bisagras' que controlan el deslizamiento del dominio central que aloja el sitio de unión del sustrato contra el dominio puerta (el llamado “elevador”). Dado que UapA forma dímeros exclusivamente a través del dominio puerta, el dominio central es el más flexible para moverse, en comparación con el dominio puerta. Esto

Introducción general

también fue fuertemente apoyado por dinámica molecular y cálculos de factores de flexibilidad B (Alguel et al., 2016).

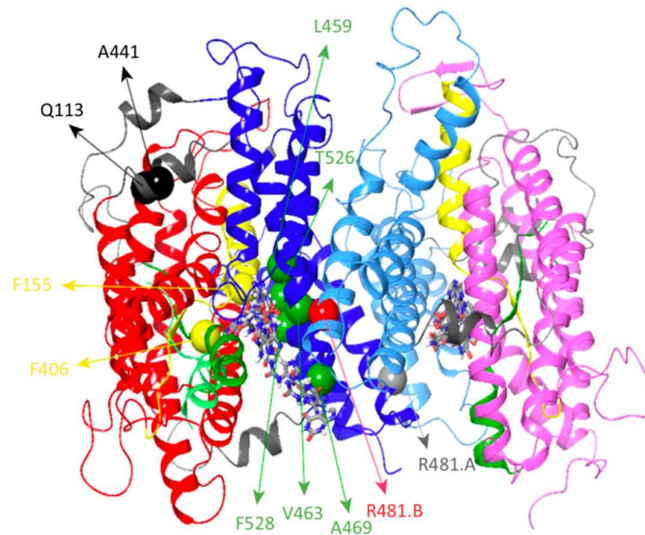


Figura 1-13: Estructura del dímero UapA. El dominio central (STM1–4 y STM8–11) que aloja el sitio de unión al sustrato se representa en cintas rojas (monómero a la izquierda) o rosadas (monómero a la derecha). En el dominio núcleo, las medias hélices discontinuas de los STM3 y STM10 que "sostienen" el sustrato, se muestran de color amarillo y verde, respectivamente. El andamio o dominio de dimerización (STM5-7 y STM12-14) que alberga la mayoría de los residuos de activación se muestra en azul (monómero a la izquierda) o celeste (monómero a la derecha). Los residuos de especificidad crítica se representan mediante esferas en el monómero izquierdo. En amarillo se marcan residuos del sitio de unión al sustrato que afectan la especificidad (F406 y F155; elementos de activación de tipo I). En verde se marcan residuos de especificidad que se encuentran a lo largo de la ruta de translocación del sustrato en la interfase del núcleo y los dominios de dimerización (L459, V463, A469, T526 y F528; elementos de activación de tipo II). En negro se marcan residuos de especificidad ubicados en bisagras flexibles que afectan el deslizamiento del núcleo (el denominado "elevador") a lo largo del dominio de dimerización (Q113 y A441; elementos de compuerta de tipo III). Extraído de (Diallinas, 2016).

Arg481, parece ser distinto a los residuos mencionados anteriormente que afectan la especificidad. Su posición está distante del sitio de unión y la trayectoria de la translocación del sustrato. Su papel funcional se hizo evidente al considerar la estructura dimérica de UapA. En el dímero, la cadena lateral de Arg481 correspondiente al monómero B se extiende hacia el sitio de unión al sustrato del monómero A y viceversa (Figura 1-13). Además, la dinámica molecular muestra que Arg481 del monómero B se acerca más a la cavidad de unión central del monómero A, donde la xantina permanece unida por Asp356 y Gln408. Este movimiento de Arg481 permite una interacción directa a través del enlace H y el apilamiento π - π con xantina. Posteriormente ocurre un cambio conformacional de la cadena lateral Arg481 y la interacción Arg481-Gln408 que "tira" la xantina hacia el interior celular. En esta trayectoria de translocación, la xantina interactúa con Leu459, Val463, Val469 y Ser466 (los residuos que se ha demostrado genéticamente

que afectan la especificidad). Por tanto, la dimerización explica el papel bastante misterioso de Arg481 en la función y especificidad de UapA (Alguel et al., 2016).

La importancia funcional de la dimerización fue apoyada experimentalmente a través del análisis cinético de cepas que co-expresan versiones de tipo salvaje y mutante de UapA (Alguel et al., 2016). También se demostró mediante técnicas moleculares (co-inmunoprecipitación y ensayos de complementación bimolecular de fluorescencia), que esta dimerización es importante para la salida del RE (Martzoukou et al., 2015)

1.8 Otros transportadores de *A. nidulans*

Varios transportadores de *A. nidulans* se han analizado mediante análisis mutacionales y modelados *in silico*, y se ha propuesto que aunque pertenecen a familias de proteínas estructural, funcional y evolutivamente distintas, tendrían una estructura 3D y un mecanismo de acción similar a UapA. Los residuos identificados como críticos se encuentran ubicados en una posición topológica similar, tienen STMs topológicamente análogos y utilizan cadenas laterales similares para cumplir con su función.

Los modelos de todas estas proteínas se han construido basándose en las estructuras cristalinas de sus homólogos estructurales más cercanos y se han correlacionado con datos experimentales (Gournas et al., 2015; Kryptou et al., 2012, 2014, 2015). En todos los casos se han identificado residuos funcionalmente importantes que están implicados directamente en la unión del sustrato y que en las estructuras modeladas se encontrarían en cavidades del sitio de unión principal.

Los estudios realizados con AzgA proponen varios residuos críticos para la función de este transportador ubicados en el STM3, STM8 y STM10. Entre ellos se propone que Asn131 (STM3), Asp339 (STM8) y Glu394 (STM10) interacciona directamente con el sustrato, mientras que Asp342 (STM8) estaría involucrado en la translocación del sustrato.

Respecto a las mutaciones que modifican la especificidad, en algunos de los transportadores estudiados se ha encontrado que se encuentran tanto dentro como fuera del sitio de unión principal. Además, las mutaciones analizadas no afectan significativamente las afinidades por los sustratos fisiológicos, por lo que al igual que lo que se propone en UapA actuarían como elementos de activación (Diallinas, 2016).

Introducción general

Un ejemplo es la mutación M389A del transportador de uracilo FurD, mutación de especificidad diseñada racionalmente que se encuentra en el STM10 fuera del sitio de unión al sustrato propuesto. La misma, provoca que la proteína adquiera la capacidad de transportar ácido úrico, xantina, alantoína e hipoxantina. Para explicarlo se ha propuesto que el STM10 tiene una inclinación flexible que funciona como una compuerta hacia el exterior (en el homólogo bacteriano Mhp1 sobre el que se construyó el modelo de FurD existe este dominio flexible) (Kryptou et al., 2015; Simmons et al., 2014). Por tanto, en FurD, una mutación en una puerta que mira hacia afuera afecta la especificidad del sustrato. Además, las combinaciones de M389A con mutaciones en residuos del sitio de unión al sustrato propuesto (N249A, Y250A e Y250F) muestran efectos aditivos, que conducen a versiones modificadas de FurD con diferentes especificidades de sustrato (Kryptou et al., 2015).

De manera similar, el análisis genético de PrnB ha demostrado que la especificidad está determinada por los residuos del sitio de unión al sustrato principal (como Lys245 en STM6), pero también por elementos de activación ubicados periféricamente o distantes del sitio de unión (Ser130 en STM3, Phe252 y Ser253 en STM6, Trp351 en STM8 y Thr414 en STM10) (Gournas et al., 2015).

La función y la especificidad de los transportadores están determinadas por interacciones sinérgicas de sitios de unión a sustrato y elementos de activación genéticamente distinguibles; dos transportadores pueden tener residuos prácticamente idénticos en los sitios de unión al sustrato, pero transportar sustratos diferentes (Diallinas, 2016; Kryptou et al., 2015). Las compuertas o filtros funcionan en conjunto con el sitio de unión al sustrato principal para catalizar la translocación selectiva de un soluto específico y excluir otros compuestos químicamente similares. A diferencia de los residuos del sitio de unión al sustrato, que son fácilmente identificables por similitud a nivel de la secuencia aminoacídica primaria, los elementos de activación y su función en la especificidad no pueden predecirse *a priori*, ya que estos elementos no están conservados.

1.9 Transportadores de purinas de basidiomicetes

Basidiomycota y Ascomycota representan los principales filos del Reino Fungi, que se estima que tienen más de 1,5 millones de especies (Blackwell, 2011). Se han descrito

Introducción general

alrededor de 100.000 especies y, de ellas, solo una décima parte se ha caracterizado en profundidad. El filo Ascomycota es el que ha recibido mayor atención, mientras que el filo Basidiomycota, que comprende más del 30% de las especies de hongos descritas, sigue siendo muy poco estudiado a pesar de su importancia en el reciclaje de carbono, el funcionamiento de los ecosistemas y las propiedades medicinales. Durante la última década, la afluencia constante de datos genómicos ha facilitado estudios comparativos que ayudan a comprender la evolución, fisiología y función de estos hongos (Eastwood et al., 2011; Floudas et al., 2012; J.-J. Liu et al., 2015; Morin et al., 2012; Riley et al., 2014). El número de genomas secuenciados de estos hongos ha aumentado notoriamente en los últimos años. Actualmente hay disponibles 594 genomas de basidiomicetes (<http://jgi.doe.gov/fungi>) en comparación con los aproximadamente 200 que había hace menos de una década o los únicos 10 disponibles solo algunos años antes (Grigoriev et al., 2014). Los avances de minería genómica sugieren un tesoro de actividades novedosas que esperan ser descubiertas y proporcionan una mayor comprensión de su estilo de vida particular (Alfaro et al., 2014; Chen, 2012; Lu et al., 2014; Wawrzyn et al., 2012; Yap et al., 2014).

Nuestro grupo viene trabajando desde hace años con los basidiomicetes degradadores de madera *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens*.

P. chrysosporium, tiene una variedad de aplicaciones potencialmente útiles para la industria debido a su capacidad de degradar la lignina y otros compuestos orgánicos recalcitrantes. Constituye el organismo modelo para los hongos degradadores de madera siendo el primer Basidiomycota secuenciado (Martinez et al., 2004; Wymelenberg et al., 2005, 2006) *P. atropurpurascens* es un organismo aislado de nuestra región, también es capaz de degradar la lignina y su sistema ligninolítico presenta similitudes y diferencias con el de *P. chrysosporium* (Alborés et al., 2014).

Nuestro grupo demostró que ambos basidiomicetes son capaces de utilizar purinas como única fuente de nitrógeno y que *P. chrysosporium* posee dos transportadores específicos de purinas funcionales (PhU y PhZ), siendo hasta la fecha los únicos transportadores de purinas de basidiomicetes caracterizados (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017).

La proteína PhU (593 aminoácidos) pertenece a la familia NAT/NCS2, su secuencia presenta alta similitud e identidad con UapA de *A. nidulans* (69% y 50% respectivamente, valor $e = 0.0$, cobertura 92%). PhU tiene los residuos conservados correspondientes al

Introducción general

motivo de firma NAT (Q425-N426-N427-G428-X4-T433-R434) y demás aminoácidos absolutamente conservados en dicha familia. La proteína PhZ (578 aminoácidos) pertenece a la familia *AzgA-like*, su secuencia presenta alta similitud e identidad con *AzgA* de *A. nidulans* (72% y 58% respectivamente, valor $e = 0.0$, cobertura 98%) y tiene el motivo y aminoácidos altamente conservados de los transportadores *AzgA-like*. Debido a que el genoma de *P. atropurpurascens* no se encuentra secuenciado, para evidenciar la presencia de transportadores de purinas se utilizaron *primers* degenerados (diseñados a partir de las zonas conservadas de las proteínas conocidas) y se identificó la presencia de un transportador tipo *AzgA-like*, denominado PuZ (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017).

La regulación de la expresión génica de *phU*, *phZ* y *puZ* se analizó por la acumulación de ARNm medida mediante RT-qPCR relativa. Se usó el gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gpd*) como gen de referencia y nitrato (fuente de nitrógeno, expresión basal) como condición calibradora. Determinamos que la expresión de *phU* es inducida por purinas (adenina, hipoxantina, xantina, ácido úrico), prolina y ausencia de nitrógeno, y reprimida por amonio, urea y algunos aminoácidos (valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina y arginina) (Figura 1-14). Este perfil es similar al observado para genes que codifican transportadores o enzimas involucradas en muchas vías catabólicas, cuya inducción depende tanto de la presencia de un metabolito de la vía (a través de un factor específico) como de la ausencia de cualquier fuente preferencial de nitrógeno (controlado por un factor de represión de nitrógeno general). Para una revisión más completa de este tema referirse a (Barraco-Vega, 2014).

En el genoma de *P. chryso sporium* se identificaron dos secuencias con dominio de dedo de zinc C2C2 (Phchr1_2079 y Phchr1_43861) que son similares a los reguladores positivos GATA de Ascomycotas. Se encontraron otras dos secuencias (Phchr1_3510 y Phchr1_2760) con un grupo binuclear de zinc C6Zn2, típicamente presentes en activadores transcripcionales específicos de las vías de utilización de purinas. Cabe señalar que en la secuencia promotora de *phU* se identificaron sitios de unión para este tipo de factores (Barraco-Vega et al., 2017).

Respecto a *phZ* se determinó que es claramente inducido por sus sustratos (hipoxantina y adenina), inducido muy levemente por xantina y reprimido por urea y aminoácidos (Figura 1-14). Este gen se expresa a un nivel casi basal cuando el ácido úrico, el amonio o la prolina son utilizados como fuente de nitrógeno, o cuando el micelio carece de

Introducción general

nitrógeno. Dado que la expresión de *phZ* es inducida por las purinas implicadas en la biosíntesis, pero no por el ácido úrico ni por la falta de nitrógeno, su expresión parece estar más vinculada al anabolismo, que al catabolismo. Respecto a *puZ* se determinó que los máximos niveles de acumulación de ARNm se dan en ausencia de nitrógeno (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017).

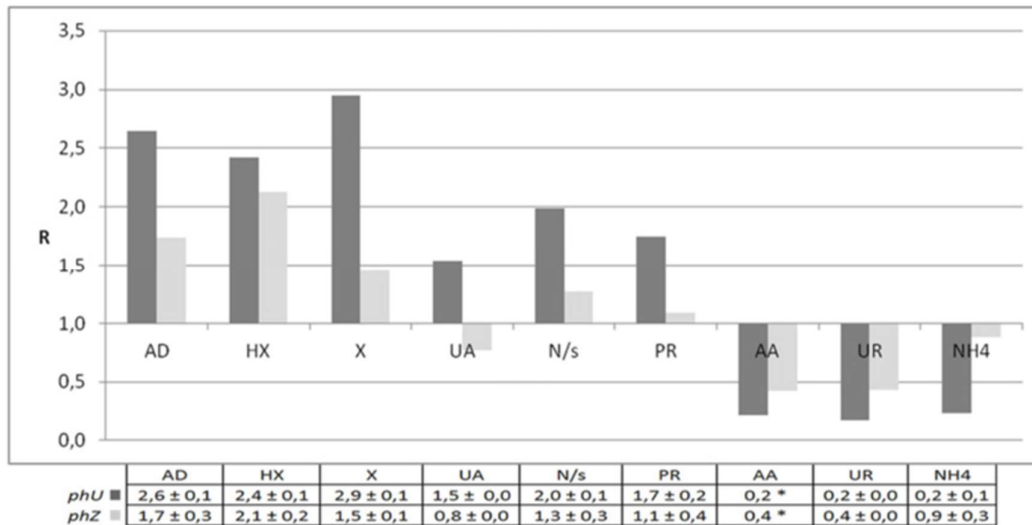


Figura 1-14: Expresión relativa de *phZ* y *phU* en respuesta a las diferentes fuentes de nitrógeno. R representa el coeficiente calculado utilizando gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*gpd*) como gen de referencia y nitrato como condición de calibrador (Pfaffl, 2001). Las fuentes de nitrógeno son: adenina (AD), hipoxantina (HX), xantina (X), ácido úrico (UA), privación de nitrógeno (N/s), prolina (PR), urea (UR), tartrato de amonio (NH₄) y aminoácidos (AA). AA representa el valor medio obtenido para los aminoácidos valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina, prolina y arginina. Extraído de (Barraco-Vega et al., 2017).

A diferencia de lo que ocurre con el filo Ascomycota, existen pocos reportes sobre los mecanismos y factores involucrados en la regulación del uso de una fuente secundaria de nitrógeno en Basidiomycota. La presencia de amonio reprime la expresión transcripcional de enzimas del metabolismo del nitrato en *Hebeloma cylindrosporum* y *Ustilago maydis* (Banks et al., 1993; Jargeat et al., 2000, 2003; C. M. Lewis & Fincham, 1970). En *U. maydis*, *Cryptococcus neoformans* y *Ganoderma Lucidu* existen proteínas funcionales tipo factor GATA que actúan como reguladores positivos en la represión del catabolismo del nitrógeno (Horst et al., 2012; Kmetzsch et al., 2011; Lee et al., 2012).

Los genes *phU* y *phZ* fueron clonados e introducidos en *A. nidulans* entre el promotor y el terminador de *azgA* lo que permitió verificar su funcionalidad, determinar la especificidad de sustratos y evaluar semicuantitativamente la capacidad transporte de cada uno. Una cepa de *A. nidulans* que es deficiente en genes transportadores purinas, se

Introducción general

transformó con *cassettes 5'UTR_azgA::trpX::gfp::riboB-AF::3'UTR_azgA* (siendo *trpX* el ADNc de *phZ* o *phU*). Como esta cepa es incapaz de utilizar purinas como fuente de nitrógeno la complementación funcional (crecimiento en purinas) indicó el transporte de la purina proporcionada en el medio a través del transportador evaluado. Las cepas AN::*phZ* no pudieron crecer en xantina y ácido úrico mientras que sí mostraron cierto crecimiento con adenina o hipoxantina. Mientras que las cepas AN::*phU* pudieron crecer con xantina o ácido úrico pero no con adenina o hipoxantina (Figura 1-15) (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017).

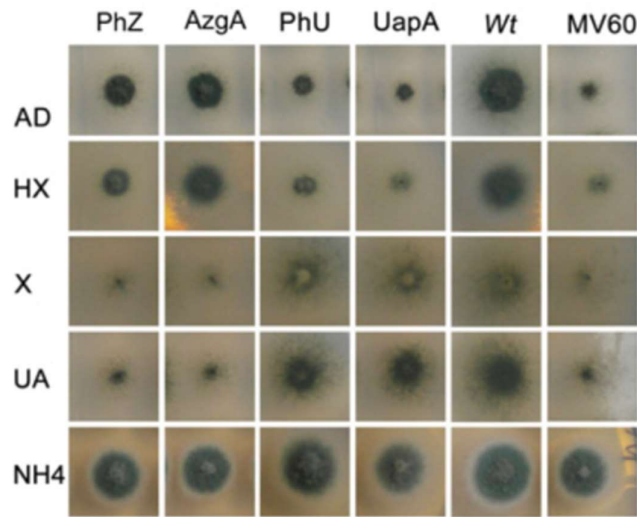


Figura 1-15: Ensayos de crecimiento de cepas de *A. nidulans* que expresan PhZ, PhU, AzgA y UapA fusionados a GFP. Como control se utilizó una cepa de *A. nidulans* de tipo salvaje (wt) y una cepa mutante *azgAΔ uapAΔ uapCΔ* (MV60). Las cepas se cultivaron a 37 ° C, en MM en presencia de adenina (AD), hipoxantina (HX), xantina (X), ácido úrico (UA) y tartrato de amonio (NH₄) como fuente de nitrógeno.

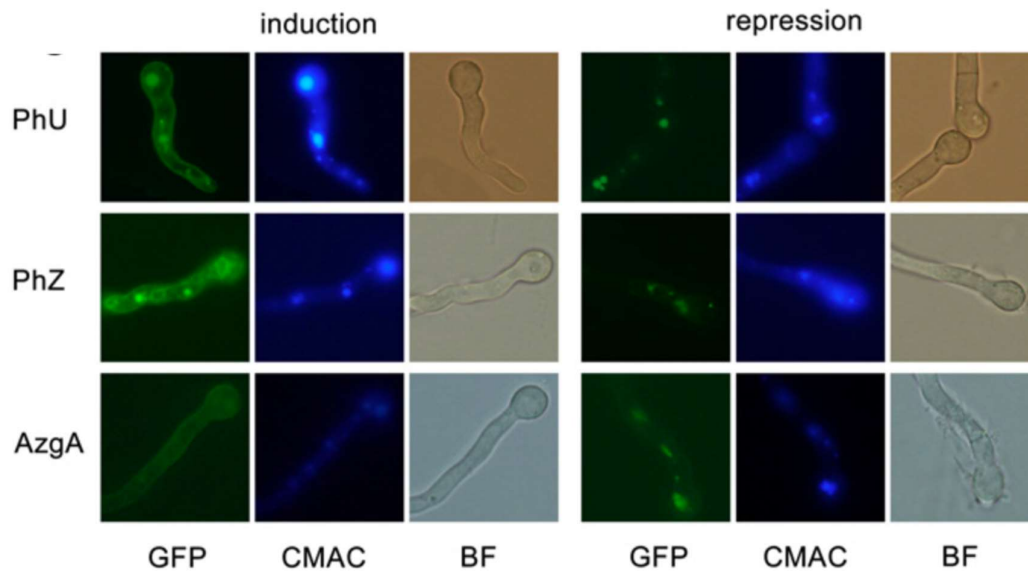


Figura 1-16: Microscopía de epifluorescencia de cepas que expresan fusiones PhZ-GFP y PhU-GFP. Cepas cultivadas en condiciones inductoras (hipoxantina, ácido úrico) y represoras (amonio). La localización AzgA-GFP se muestra como control. Los paneles de la izquierda muestran la fluorescencia de GFP; paneles intermedios, tinción vacuolar con CMAC; paneles derechos, campo claro. Extraído de Barraco-Vega et al. 2017

La fusión con GFP permitió verificar que ambos transportadores, PhZ-GFP y PhU-GFP, se localizaron en la membrana plasmática de esporas germinadas cultivadas en los sustratos adecuados (hipoxantina o ácido úrico respectivamente). También se observaron en compartimentos globulares intracelulares que coinciden con el marcador de tinción vacuolar CMAC (Figura 1-16). En condiciones de represión (presencia de amonio), la cantidad de proteínas de fusión en las vacuolas aumentó notablemente, mientras que disminuyó drásticamente la asociación a la membrana. AzgA-GFP mostró casi la misma topología e internalización. Este fenómeno, donde el amonio conduce a la internalización de los transportadores en estudio por endocitosis, también se ha observado para otros transportadores quiméricos en *A. nidulans* (Amillis et al., 2004; Pantazopoulou et al., 2007; Valdez-Taubas et al., 2004). Sin embargo, se observaron algunas pequeñas diferencias con las quimeras transportadoras de *P. chrysosporium*. En presencia de sus sustratos, PhZ-GFP y PhU-GFP presentaron un mayor nivel de fluorescencia vacuolar en comparación con el control AzgA. La cantidad de transportador en estas vacuolas fue, por lo tanto, notoriamente mayor. También se observó fluorescencia de PhZ-GFP en anillos citoplásmicos que podrían corresponder al RE. Como todos los genes se clonaron bajo el mismo promotor, no se espera ninguna diferencia en la expresión génica. Por lo

Introducción general

tanto, las mayores cantidades de proteínas que no alcanzaron la membrana podrían ser indicativas de diferencias en el procesamiento y/o tránsito de proteínas relacionadas con la estructura de los transportadores de *P. chrysosporium*. Estos resultados sugieren que PhZ y PhU podrían presentar un mecanismo de regulación similar al de UapA. En presencia de sustratos, la proteína es endocitada, siguiendo la vía de cuerpo multivesiculares, para ser degradada en vacuolas. Como se describió anteriormente, la endocitosis de UapA depende de la ubiquitinación de un residuo de lisina (K572) mediado por HulA^{Rsp5} y ArtA (Gournas et al., 2010; Karachaliou et al., 2013). Usando un predictor (PDM-PUB) encontramos residuos de lisina en PhZ y PhU que podrían ubiquitinizarse, K576 y K591 respectivamente (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017)

Las medidas semicuantitativas de transporte permitieron determinar que: PhZ transporta las purinas más reducidas, adenina, hipoxantina y guanina, y análogos (2-aminopurina, 6-tioguanina y 8-azaguanina); PhU, transporta todas las purinas y análogos (oxipurinol, uracilo, uridina y 2-aminopurina). Ambas comparten sustratos con los homólogos de *A. nidulans*, pero tanto PhZ como PhU presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos con AzgA y UapA, respectivamente, cuando son expresadas en el mismo contexto genético y por tanto metabólico (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017). En base a estos resultados se planteó la hipótesis de que existen residuos claves directamente implicados en la conformación de la estructura y función (especificidad, cinética) de estos transportadores, que explicarían las diferencias observadas entre los transportadores de *P. chrysosporium* y sus homólogos de *A. nidulans*.

2 Análisis de PhZ

Transportador de purinas tipo *AzgA-like* de
Phanerochaete chrysosporium

2.1 Introducción

La familia de transportadores *AzgA-like* se ha definido históricamente a través de la permeasa *AzgA* de *Aspergillus nidulans*. A diferencia de lo que ocurre con UapA y las proteínas de tipo NAT, poco se sabe a nivel de los determinantes estructurales de la función de proteínas *AzgA-like*. Estos transportadores presentan una baja similitud de secuencia primaria con las proteínas NAT y los análisis filogenéticos las posicionan en *clusters* separados (Cecchetto et al., 2004). Sin embargo, estudios más recientes proponen que a pesar de esta distancia filogenética los transportadores *AzgA-like* son estructuralmente similares a los NAT, tienen STMs topológicamente análogos y utilizan cadenas de aminoácidos similares para cumplir con su función (Kryptou et al., 2014; Papakostas et al., 2013). Es por esta razón que se propone agruparlos como dos subfamilias dentro de una gran familia (Gavriil et al., 2018). Así la familia NAT incluiría a la subfamilia UapA/C-*like* compuesta por transportadores específicos de ácido úrico y xantina y la subfamilia *AzgA-like* comprendida por proteínas que transportan específicamente hipoxantina, adenina y guanina. Los mutantes analizados hasta la fecha en *AzgA* y las dos permeasas *AzgA-like* de *Escherichia coli* respaldan la hipótesis planteada, pero sería necesario estudiar un mayor número de residuos para sustentar que dos grupos de proteínas funcional y evolutivamente distintos como son los transportadores *AzgA-like* y NAT sean tan similares desde el punto de vista estructural.

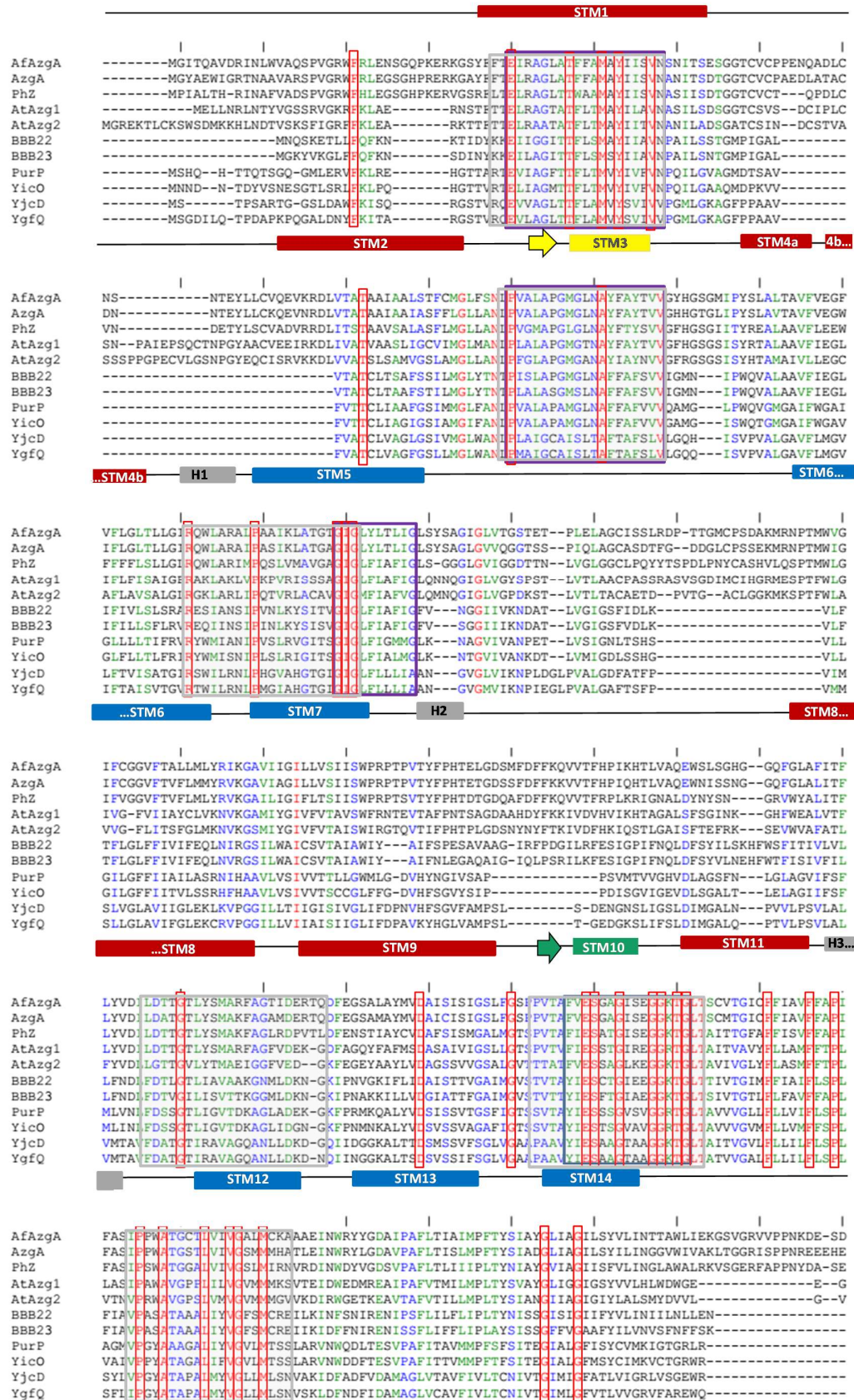
Previamente se identificaron 35 residuos invariantes y cuatro motivos conservados en todas las proteínas *AzgA-like* (Barraco-Vega, 2014). Se analizaron todas las proteínas *AzgA-like* de función verificada (incluida PhZ) y 144 secuencias de proteínas hipotéticas (29 de procariotas, 35 de plantas, 54 de hongos Ascomycotas y 26 de Basidiomycotas). Estos motivos no están presentes en proteínas de otras familias de transportadores, siendo característicos de esta familia. Paralelamente Papakostas y colaboradores (2013) publicaron un trabajo similar en base a nueve secuencias (7 bacterianas, 2 de plantas y 2 de hongos Ascomycotas) y describieron la presencia de 45 residuos invariantes y seis motivos conservados, tres de los cuales solapan completamente con los motivos que nuestro grupo denominó 1, 2 y 4 y otro solapa parcialmente con el que se denominó motivo 3 (a nivel del submotivo GIG) (Barraco-Vega, 2014) (Figura 2-1). Es importante destacar que la utilización de un mayor número de secuencias y la inclusión de secuencias de hongos Basidiomycotas, explican la reducción a nivel de la cantidad de residuos

Análisis de PhZ

invariantes y de motivos conservados; también explica la menor conservación en cada posición dentro de los motivos que nuestro grupo describió previamente. El análisis de mutantes en los residuos de estos motivos podría contribuir al conocimiento de la relación estructura-función de las proteínas *AzgA-like*.

El modelo tridimensional de *AzgA* construido en base al cristal del transportador de uracilo de *E.coli* (*UraA*) plantea una estructura muy similar a la de *UapA*: 14 STM topológicamente agrupadas en un dominio núcleo compacto formado por STM1-4 y STM 8-11 y un dominio de entrada más flexible formado por los STM 5-7 y 12-14. Se propone que entre estos dominios se encuentra la cavidad donde se une el sustrato. En el modelo (Figura 2-2), *AzgA* interactúa con sus sustratos fisiológicos (hipoxantina, adenina y guanina) a través de enlaces de hidrógeno formados por las cadenas polares de los residuos N131 (TMS3), D339 (TMS8) y E394 (TMS10) y el grupo amida del esqueleto de V393 (TMS10) que interactúan con N1(H) y C6=O (hipoxantina y guanina), C6-NH₂ (adenina) del anillo pirimidínico y N7(H) y N9(H) del anillo imidazol. Una red de enlaces de hidrógeno entre D339-E394-D342 estaría implicada en la unión de protones y la translocación de sustratos. Además, el grupo C2-NH₂ de la guanina interactúa con N131 y T390 mediante un doble enlace de hidrógeno, y una interacción débil π - π (apilamiento) con F392 estabilizaría la unión con hipoxantina y guanina (Figura 2-2). Cuando se introducen los cambios, D339N/E/A, D342N/A, T390A o E394Q/A se produce pérdida total o reducción del transporte, mientras que con las mutaciones N131D/A la proteína se comporta como la versión silvestre. Cambios en otros dos residuos (G129F y G402A) producen pérdida total o reducción del transporte. Los residuos identificados como críticos para la función de los transportadores homólogos de *E. coli* (*PurP* y *YjcD*) coinciden con los de *AzgA* (Kryptou et al., 2014; Papakostas et al., 2013).

Análisis de PhZ



STM14b

Figura 2-1 Análisis de PhZ, y homólogos AzgA-like con función conocida. Alineamiento mediante ClustalW de PhZ; AzgA de *A. nidulans* (GI: 67903094); AfAzgA de *Aspergillus fumigatus* (GI: 70997864); Atzgl1 y Atzg2 de *Arabidopsis thaliana* (GI: 9759032, 9759032); PurP, YicO, YjcD y YgfQ de *E. coli* (GI: 16131582, 161784317, 84028043, 55977858); BBB22 y BBB23 de *Borrelia burgdorferi* (GI: 11497023, 364556795). Se omitió región 541-610 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Los recuadros azules indican los motivos conservados definidos según (Barraco-Vega, 2014) y los grises los definidos según (Papakostas et al., 2013). Los residuos invariantes en todas las AzgA-like analizadas (incluidas las 144 proteínas hipotéticas) se muestran recuadrados en rojo. Sobre el alineamiento se esquematiza la estructura secundaria propuesta para PhZ según el modelo tridimensional construido (ver Sección 2.3.7). Los segmentos transmembrana (STM) se representan mediante rectángulos rojos y azules, las hojas β mediante flechas y las hélices internas mediante rectángulo grises. Según el modelo planteado la proteína se dispone en dos dominios, un dominio flexible denominado entrada, cuyos STM se representan en azul y un dominio compacto denominado núcleo cuyos STM se representan en rojo. En amarillo y verde se marcan los segmentos que forman el motivo β antiparalelo.

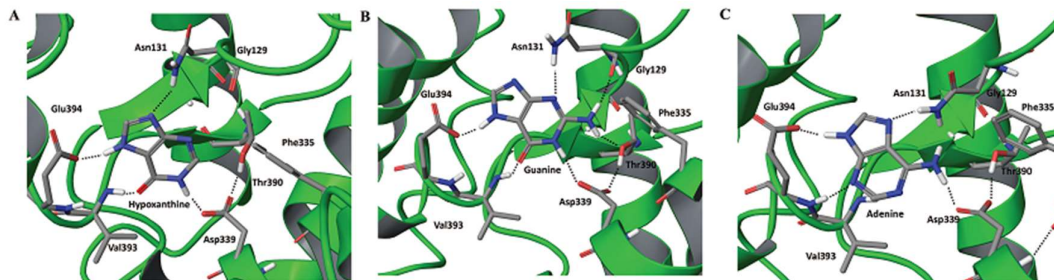


Figura 2-2: Interacciones AzgA-sustrato. Representación esquemática de la interacción AzgA-hipoxantina en A, AzgA-guanina en B y AzgA-adenina en C. Extraído de Kryptou *et al.*, 2014.

La secuencia de PhZ (578 aa) presenta alta similaridad con AzgA (58% identidad, 72% de similitud, 98% cobertura). PhZ transporta los mismos sustratos que AzgA y presenta la misma regulación postraduccional (responden al mecanismo de endocitosis en respuesta a una fuente primaria de nitrógeno) pero presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos ya que cuando son expresados en el mismo contexto genético (y por tanto metabólico) se obtienen diferentes eficiencias de transporte. Por ejemplo PhZ transporta 8-azaguanina (análogo tóxico de purina) de forma menos eficiente que AzgA (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017). En base a estos resultados planteamos la hipótesis de que analizando las diferencias en residuos claves se podrían explicar las diferencias observadas en el transporte.

2.2 Objetivos del capítulo

2.2.1 Objetivo general:

Aportar a la consolidación de un modelo estructural de proteínas de la familia *AzgA-like* sustentado en evidencias biológicas.

2.2.2 Objetivos específicos:

- i) Identificación de residuos críticos para PhZ
- ii) Validación del rol de residuos seleccionados.
- iii) Modelado de la proteína PhZ.

La estrategia planteada para cumplir con estos objetivos fue el análisis del transportador *AzgA-like* de *P. chrysosporium* (PhZ), analizando mutantes en residuos seleccionados de este transportador y correlacionando los resultados obtenidos con la estructura tridimensional. La selección de los residuos a mutagenizar se realizó mediante análisis comparativo de secuencias (proteínas *AzgA-like* de función verificada e hipotéticas) y modelado estructural por homología. También se analizaron mutaciones generadas al azar (producidas por errores de la ADN polimerasa).

La proteína silvestre y variantes mutantes se expresaron en un mismo contexto genético: cromosoma 8, en el locus *azgA*. Para dirigir la integración en dicho *locus*, cada secuencia de *phZ* (silvestre o mutante), fusionada a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (*gfp*) y junto a un gen de selección (*riboB*, complementa la mutación *riboB2*, que provoca la auxotrofia por riboflavina) (*phZ::gfp::riboB*), fue introducida entre secuencias 5' y 3' UTR del gen *azgA* de *A. nidulans* y transformada en una cepa de *A. nidulans* carente de los transportadores de purinas principales y por lo tanto incapaz de utilizar purinas como fuente de nitrógeno (Barraco-Vega et al 2017). Las secuencias 5' y 3' UTR de *azgA* dirigen la integración al locus por recombinación homóloga, evento que se ve favorecido ya que la cepa receptora porta además una delección en el gen *nkuA* (ver Sección 6.5.18) (Nayak et al., 2006).

Una vez seleccionados los transformantes, se analizó la integración descartando todos aquellos que presentaron más de una copia o que no se integraron correctamente en el

locus azgA. El efecto de las mutaciones generadas se evaluó por crecimiento en presencia de purinas y análogos, ensayos de transporte (*uptakes*), seguimiento *in vivo* de la localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia, y análisis de la expresión y estabilidad proteica (*western blot*).

2.3 Resultados

2.3.1 Selección de residuos candidatos mediante análisis comparativo de secuencias

La primera estrategia utilizada para la identificación de posibles residuos determinantes para la funcionalidad de las proteínas *AzgA-like* comenzó con el análisis de los motivos característicos. Se realizó un análisis comparativo (alineamiento de secuencias) con todas las proteínas *AzgA-like* de función verificada (incluida PhZ) y 144 secuencias de proteínas hipotéticas deducidas de genomas secuenciados (29 de procariontes, 35 de plantas, 54 de hongos Ascomycotas y 26 de Basidiomycotas) (Barraco-Vega, 2014). Mediante este análisis identificamos (Figura 2-1):

- 35 residuos invariantes (numeración según PhZ): F22 (amino terminal); E41, T48, M52, Y54 y V58 (STM1); T99 (STM2); P117 (*loop* STM2-3); A128 (STM3); R168 (hélice interna); P176 (STM5); G186, I187 y G188 (STM5); G340 (STM8); D369 (STM9); G380 (*loop* STM9-10); E389, S390 y G393 (STM10); G397, G398 y T400 (*loop* STM 10-11); G401 (STM 11); F411 y F416 (STM11); P418 (hélice interna); P425 y A428 (*loop* hélice-STM12); L433, V436, G437 y M440 (STM12), G474 y G478 (STM14).

- cuatro motivos sumamente conservados que no están presentes en otras familias de transportadores (X representa cualquier aminoácido):

Motivo 1: E-X2-[AG]-[GA]-X-[ATV]-T-[FW]-X-[ATS]-M-X-Y-[IS]-[ILV]-X-V-N

Motivo 2: P-X-[AGS]-X-[AG]-[PSC]-[GA]-[MLI]-[GS]-X-[NT]-A-[YF]-X-[AT]-[YF]-X2-V

Motivo 3: G-I-G-X-[FY]-[LI]-X3-[GA]

Motivo 4: [FY]-[IV]-E-S-X-[AST]-G-X2-[EAV]-G-G-[RKA]-T-G.

Análisis de PhZ

La mayor diversidad de residuos en estos cuatro motivos se encuentra en secuencias de origen procariota; si se consideran solo las secuencias de hongos y plantas los motivos tienen mayor grado de conservación (Figura 2-3).

Bajo la hipótesis de que analizando residuos de estos motivos se encontrarían residuos claves en la función de las proteínas *AzgA-like*, inicialmente se decidió analizar uno de los motivos que según los predictores de estructura secundaria (TMHMM, (Moller et al., 2001) se encuentra orientado hacia el exterior (motivo 2) y otro orientado hacia el interior celular (motivo 4). Los modelos tridimensionales generados (ver Secciones 2.3.2 y 2.3.7) apoyarían la ubicación de ambos motivos y su orientación: el motivo 2 en el STM3 orientado hacia el exterior de la célula y el motivo 4 en el STM10 orientado hacia el interior (Figura 2-1).

Para seleccionar los residuos dentro de estos motivos, se descartaron: i) los residuos de mayor variabilidad, ya que probablemente tuvieran menor incidencia en la estructura y la función; y ii) los residuos invariantes y residuos conservados en las secuencias de plantas y hongos (con el objetivo de generar mutaciones de cambio de función, en particular en lo que refiere a especificidad de sustrato y capacidad de transporte, y minimizar aquellas de pérdida total de función). Entre los restantes, se eligió mutar aquellos residuos que, al comparar las secuencias de las proteínas de función conocida, PhZ presenta un aminoácido diferente a los presentes en las secuencias de hongos (*AzgA* y *AfAzgA*). Así, PhZ es el único que en el motivo 2 presenta leucina en la posición 124 (L124) en lugar de metionina, tiene treonina en la posición 131 (T131) en lugar de alanina y en la posición 133 tiene serina (S133) en lugar treonina. Respecto al motivo 4, PhZ es el único que tiene isoleucina en la posición 388 (I388) en lugar de valina, posee alanina en la posición 391 (A391) en lugar de glicina y es el único que tiene treonina en la posición 392 (T392) en lugar alanina. Se decidió entonces, sustituir cada uno de estos residuos de PhZ por el correspondiente en sus homólogos fúngicos y generar las versiones de PhZ con los cambios: L124M, T131A, S133T, I388V, A391G y T392A (Figura 2-1 y Figura 2-7).

Motivo 1					Motivo 2					Motivo 3					Motivo 4				
AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.	AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.	AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.	AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.
41	E	E	E	E	117	P	P	P	P	186	G	G	G	G	387	F/Y	F/Y	F/Y	F/Y
42	X	X	X	X	118	V/L	V/I	L/F	X	187	I	I	I	I	388	I/V	I/V	I/V	I/V
43	R	R	R	X	119	A/G/S	A/G	A/G	A/G/S	188	G	G	G	G	389	E	E	E	E
44	A/G	A	A	A/G	120	X	L/V/M	L	X	189	L/I	L	L/M	L	390	S	S	S	S
45	G	G	G/A	G	121	A	A	A	A/G	190	F/Y	F/Y	F	F	391	G/A	G/A	S/T	X
46	X	X	T/A	X	122	P	P	P	P/S/C	191	L	L/I	LI	L/I	392	A/S	A/T	A/T	A/S/T
47	A/T/V	A/T	A/T	T	123	G	G	G	G/A	192	A/T	A/T	A	A/T/L	393	G	G	G	G
48	T	T	T	T	124	M/L	M/L	M	M/L/I	193	F/L/I	F/L/I	F	X	394	I	I	I/L	V/I/T
49	F	F/W	F	F	125	G	G	G	G/S	194	I	I	I/T/V	I/M/V	395	X	S/A	R/K	X
50	F/A	F/A	L	L/V/M	126	L/V	L	X	L	195	G	G	G	G/A	396	E	E	E	E/A/V
51	A	A	T	A/T/S	127	N	N	N	N/T						397	G	G	G	G
52	M	M	M	M	128	A	A	A	A						398	G	G	G	G
53	A/S	A	A	X	129	Y	Y	Y	Y/F						399	R/K/A	K	R/K	R/K
54	Y	Y	Y	Y	130	F	F/L	F/L/I	F/T						400	T	T	T	T
55	I	I	I	I/S	131	A/T	A/T	A/T	A/T						401	G	G	G	G
56	I/L	I	I/L	I/L/V	132	Y/F	Y/F	Y	Y/F										
57	S/A	S/A	S/A/T	X	133	T/N/Q	S/T	T/N	S/T/V										
58	V	V	V	V	134	V/I	V/I	V/M/L	V/L										
59	N	N	N	N/V	135	V	V	V	V										

Figura 2-3: Aminoácidos presentes en los motivos AzgA-like. Se muestra el análisis realizado a partir del alineamiento obtenido mediante ClustalW de las proteínas AzgA-like de función conocida y 144 hipotéticas (Barraco-Vega, 2014). La numeración de los aminoácidos marcados se corresponde con la secuencia de PhZ. X representa cualquier aminoácido.

2.3.2 Selección de residuos candidatos mediante análisis de la estructura tridimensional

Para seleccionar los residuos candidatos se buscaron aquellos que, según la estructura de PhZ, pudieran interactuar con el sustrato. La estructura tridimensional fue modelada por homología en base a la estructura cristalográfica de UapA de *A. nidulans* (ver Sección 6.7.3). Para identificar los residuos candidatos se analizó el modelo obtenido mediante dos abordajes. El primer abordaje implicó el análisis de los residuos que quedan entorno a la molécula de sustrato cuando las coordenadas de la molécula de xantina, presente en la estructura cristalográfica de UapA, son trasladadas al modelo de PhZ. El segundo abordaje consistió en abordar aspectos del reconocimiento del sustrato mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*), utilizando el programa *Autodock tools* (Morris et al., 2009).

Mediante el primer abordaje (Figura 2-4) se pudo ver que varios de los residuos que quedan en torno a la molécula de sustrato serían los mismos que en UapA: D337/D360, T385/T404, F387/F406 (numeración PhZ/UapA) pero otros son diferentes como: Y54, E389 y A386 que en UapA son sustituidos por G, Q y T, respectivamente). Y54 es un residuo invariante en todas las proteínas AzgA-like, según el modelo, este residuo está localizado próximo al oxígeno de la xantina (sustrato de UapA), que no está presente en

la hipoxantina (sustrato de PhZ). Con esto planteamos la hipótesis de que el carbonilo de la tirosina podría reemplazar el oxígeno de la xantina y reducir la afinidad de PhZ por esta purina. Para explorar esta hipótesis se decidió construir el mutante Y54G de PhZ. Otra de las diferencias que se observa al analizar el modelo, es el oxígeno del glutamato en PhZ respecto al nitrógeno de la glutamina en UapA. Aunque el mutante E389Q se determinaba como un buen candidato se decidió no analizarlo ya que análisis similares ya han sido abordados tanto en UapA como en AzgA (ver Discusión, Sección 2.4).

En el segundo abordaje, con la estructura modelada para PhZ se realizaron distintos *docking* utilizando como ligandos los sustratos hipoxantina y 8-azaguanina que se acoplaron a la estructura modelada (ver Sección 6.7.5). Las diez mejores conformaciones generadas con cada sustrato fueron analizadas y ordenadas en base al criterio de energía de interacción. Con hipoxantina las 7 conformaciones con menor energía (-2,64 a -2,53 kcal/mol) definieron el *cluster* mayoritario (*cluster* 1). Las otras tres conformaciones conformaron 2 *clusters*: una con dos conformaciones (-2,51 y -2,46 kcal/mol, *cluster* 2) y otra con una única conformación (0,67 kcal/mol, *cluster* 3). Con 8-azaguanina las 10 conformaciones con menor energía de interacción quedaron agrupadas en dos *clusters* con 5 conformaciones cada uno, las 5 conformaciones de menor energía (-1,57 a -1,53 kcal/mol) conformaron el *cluster* 1 y las otras 5 conformaciones (-0,83 a -0,73 kcal/mol) conformaron el *cluster* 2 (Figura 2-5 y Figura 2-6).

Los residuos de PhZ que participarían de la interacción con el sustrato se analizaron mediante el programa LigPlotplus (Wallace et al., 1995) para las conformaciones de menor energía obtenidas para cada *cluster*, tanto con hipoxantina como con 8-azaguanina. Con hipoxantina el análisis de los *clusters* con menor energía propone que los residuos que interaccionan con el sustrato formando enlaces de hidrógeno son N59 y P122 (*cluster* 1) o L124 y G125 (*cluster* 2). Con el tercer *cluster* los residuos candidatos son A128, Y129, D334 y P383 (Figura 2-5). Con 8-azaguanina el análisis propone que los residuos que interaccionan con el sustrato formando enlaces de hidrógeno serían N127 y T66 según el *cluster* 1 y L126, A128, Y129, D334, P383 según el *cluster* 2 (Figura 2-6).

Se seleccionaron para continuar con el análisis las interacciones que aparecían representadas con ambos sustratos (*cluster* 3 para hipoxantina y *cluster* 2 para 8-azaguanina). Para explorar este posible esquema de interacción se seleccionaron 2 residuos invariantes en todas las proteínas AzgA-like fúngicas: A128 e Y129. Sustituyendo el primero por fenilalanina (A128F) ya que es el residuo topológicamente análogo de UapA y el segundo por aspartato (Y129D) (Figura 2-7).

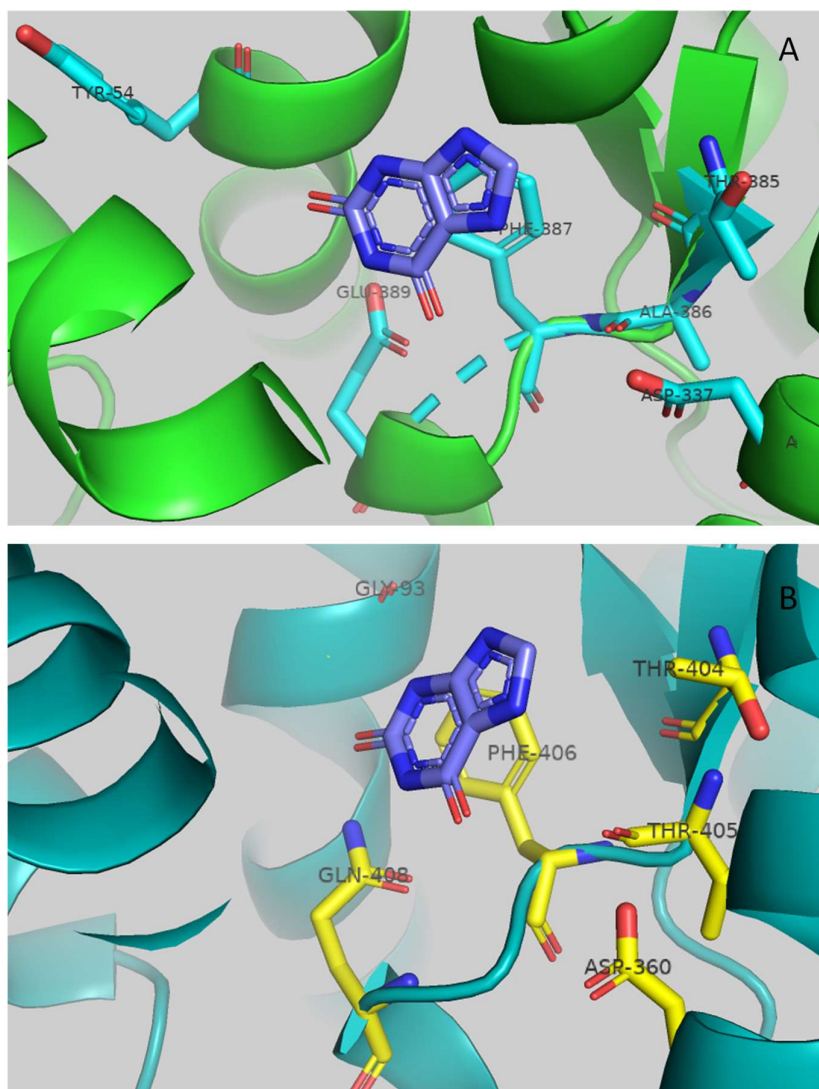


Figura 2-4: Identificación de residuos candidatos en base al modelado tridimensional de PhZ: A) En celeste se muestran los residuos de PhZ que podrían interactuar con el sustrato cuando se trasladan las coordenadas de la molécula de xantina cristalizada junto a UapA (Alguel et al., 2016). B) En amarillo se muestran los residuos de UapA, homólogos a los descritos en la parte A, entorno a la molécula de xantina. Los residuos Y54, E389, D337, A386, T385 y F387 de PhZ se corresponden con G93, Q408, D360, T405, T404 y con F406 de UapA, respectivamente.

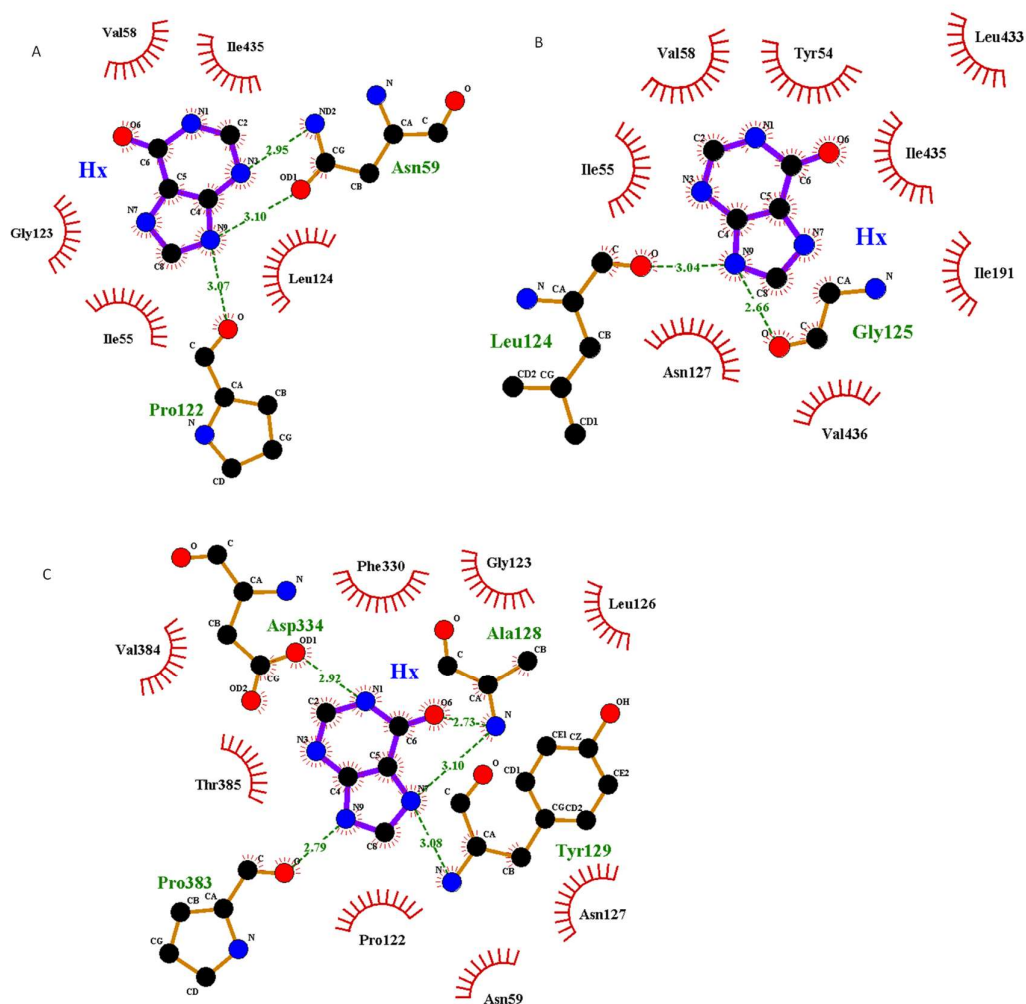


Figura 2-5: Interacción PhZ-hipoxantina. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de xantina que interaccionan con PhZ obtenidas mediante Autodock. A) *Cluster 1*, representado por 7 de 10 conformaciones con energía de interacción -2,64 a -2,53 kcal/mol B) *Cluster 2* representado por dos conformaciones con -2,51 y -2,46 kcal/mol de energía de interacción. C) *Cluster 3* representado por una conformación con 0,67 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rayadas rojas se representan otras interacciones.

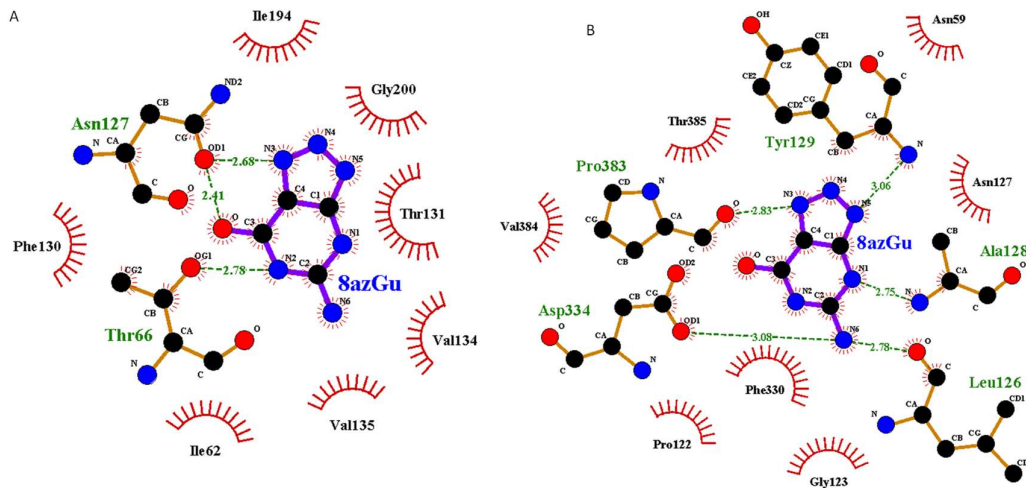


Figura 2-6: Interacción PhZ-8-azaguanina. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de 8-azaguanina que interaccionan con PhZ obtenidas mediante Autodock. A) *cluster 1*, representado por 5 de 10 conformaciones con energía de interacción -1,57 a -1,53 kcal/mol. B) *Cluster 2* representado por 5 de 10 conformaciones con -0,83 y -0,73 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rojas rayadas se representan se representan otras interacciones.

2.3.3 Generación y análisis de mutantes de PhZ

Los cambios en la secuencia codificante de *phZ* se introdujeron por mutagénesis dirigida mediante el método de QuickChange (Ishii et al., 1998; Munteanu et al., 2012). Los plásmidos resultantes fueron secuenciados y una vez verificados se utilizaron como molde para la amplificación de la totalidad del ADNc (ver Sección 6.5.17). De esta forma se obtuvieron secuencias de *phZ* que se diferencian de *phZ* silvestre en uno de los residuos que codifican (mutaciones puntuales simples). Para expresar las variantes mutantes y la proteína silvestre en el mismo contexto genético, para cada mutación se construyó un *cassette* fusionando la secuencia codificante de *phZ* con el 5' y 3'UTR de *azgA*. En la construcción del *cassette* también se incluyó la fusión al gen que codifica para la GFP y al gen que complementa la auxotrofia por la riboflavina (para la posterior selección de los transformantes). Cada *cassette* se construyó mediante 3 PCR independientes y una PCR de fusión (Fusion-PCR). El primer fragmento (región 5'UTR *azgA*) se amplificó usando un *primer* reverso que además de 20 nucleótidos específicos de la secuencia contiene los primeros 20 nucleótidos de *phZ*. La secuencia *gfp-riboB-3'UTR_azgA* (previamente clonada) se amplificó usando un *primer forward* que incluye 20 nucleótidos adicionales que complementan con el final de la secuencia codificante del transportador

Análisis de PhZ

sin incluir el codón de terminación. De esta forma se generaron amplicones 5' y 3' que solapan en 20 nucleótidos al gen *phZ* y por tanto los tres fragmentos actúan tanto de ADN molde como de *primers* en la PCR final. Este último paso de construcción es la amplificación con *primers* desde los bordes, obteniéndose como resultado una única molécula integrada: 5'UTR_*azgA-phZ*_mutado-*gfp-riboB*-3'UTR_*azgA* de 6487pb (Para más detalles ver Sección 6.5.18).

Estos *cassettes* se usaron para transformar la cepa Δ ZAC de *A. nidulans* dirigiendo la integración al locus *azgA*. De esta forma se generaron las cepas de *A. nidulans* que expresan PhZ con los cambios: L124M, T131A, S133T, I388V, A391G y T392A (seleccionados mediante análisis comparativo de secuencias); Y54G, A128F e Y129D (seleccionados mediante análisis de la estructura tridimensional) (Figura 2-7). Adicionalmente se analizaron las mutaciones V58A, A148V, A418V y T429P (Figura 2-7), las cuales fueron obtenidas al azar por error de la ADN polimerasa durante la construcción de los *cassettes* para transformación. En un primer *screening* (fenotípico) se evaluaron como mutantes dobles junto a otro de los cambios seleccionados y luego dado los resultados obtenidos se construyeron los mutantes simples siguiendo el mismo esquema de trabajo que con el resto de los residuos seleccionados.

Para los 13 *cassettes* construidos se verificó la ubicación de la inserción en el locus *azgA* por PCR en tiempo final y el número de copias por qPCR (ver Sección 6.5.16). Se continuó solo con los mutantes que tenían una única inserción en el locus correcto. De esa forma las 13 cepas construidas son idénticas entre sí y solo se diferencian en la proteína en estudio. El gen *phZ* de los transformantes seleccionados fue secuenciado para verificar la presencia de los cambios deseados en la secuencia del gen de interés.

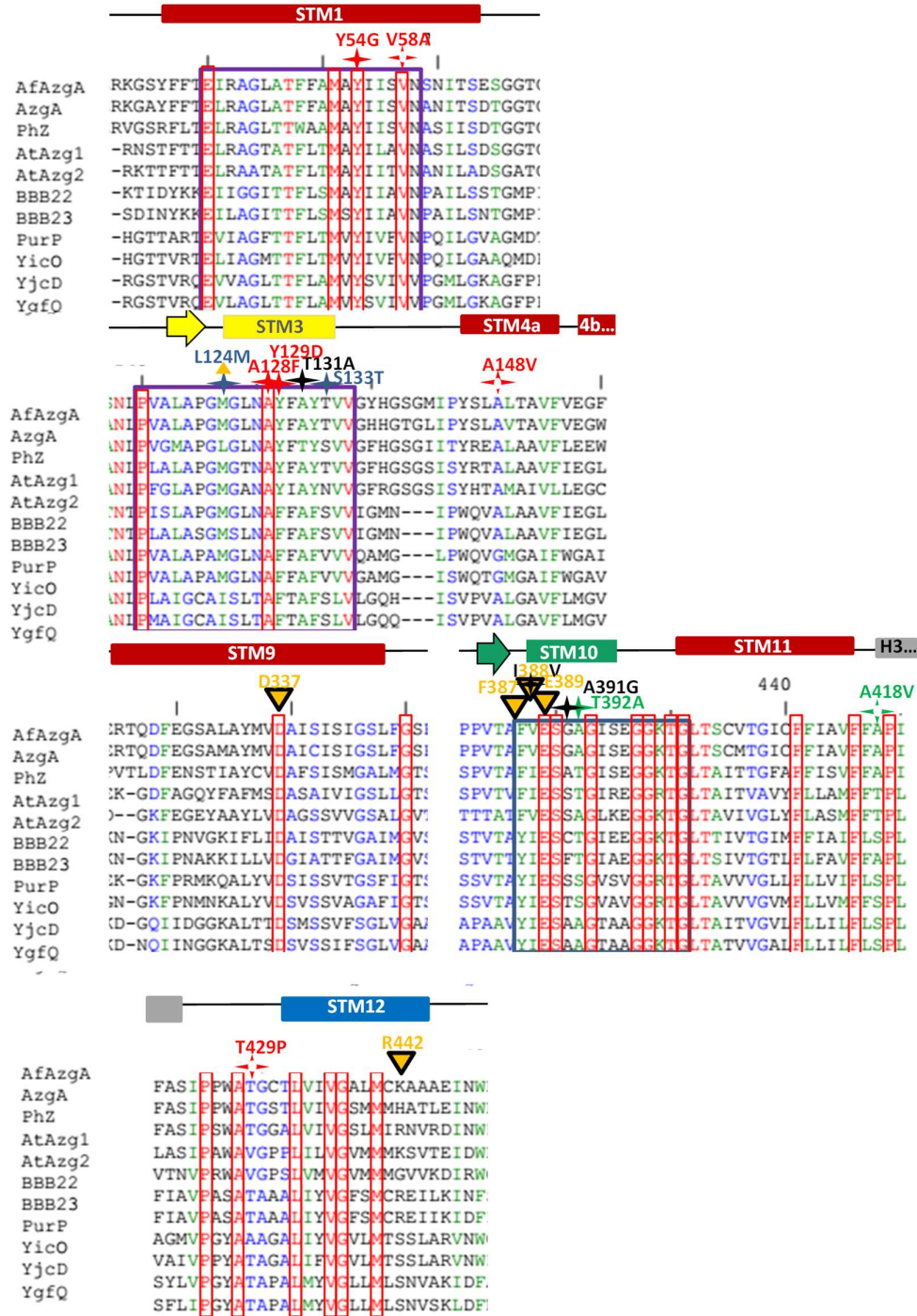


Figura 2-7: Localización de residuos de PhZ analizados: Extracto del alineamiento mostrado en Figura 2-1. Se esquematiza la ubicación de las 13 mutaciones realizadas en este trabajo y los residuos que conforman el sitio de unión principal. En amarillo y verde se marcan los segmentos que forman el motivo β antiparalelo. Con estrellas se marcan los residuos de PhZ que fueron mutados en este trabajo. En rojo se marcan las mutaciones con las que se obtiene pérdida de función del transportador, en azul las mutaciones que provocan disminución del transporte, en verde las que provocan aumento de transporte y en negro aquellas mutaciones para las que no se observó efecto. El círculo blanco en la estrella que marca el residuo, indica aquellas mutaciones que fueron obtenidas por mutagénesis al azar. Con triángulos naranjas se marcan

los residuos que conforman el sitio de unión según el modelo planteado (ver Sección 2.3.7). Para ver más referencias dirigirse a Figura 2-1.

2.3.4 Análisis del transporte en mutantes PhZ

Las cepas seleccionadas se evaluaron mediante test de crecimiento en presencia de purinas y análogos. El crecimiento sirve como medida cualitativa de transporte ya que con el sistema utilizado la capacidad de utilizar una purina, cuando es la única fuente de nitrógeno disponible, indica si la proteína en estudio transporta o no la purina evaluada. Cuando la mutación disminuye el transporte, el crecimiento de la colonia en el mutante es menor que la del silvestre, y si la colonia mutante muestra un mejor crecimiento que la del silvestre, el cambio está provocando un aumento en el transporte. Por el contrario, pero en el mismo sentido, la ausencia de crecimiento en presencia del análogo tóxico 8-azaguanina indica que la proteína en estudio transporta el tóxico, y la resistencia a este compuesto indica que la proteína en estudio no es capaz de transportarlo.

Se evaluó el crecimiento de todas las cepas usando como única fuente de nitrógeno: hipoxantina, adenina, guanina, xantina, ácido úrico, o amonio (fuente de nitrógeno no relacionada con purinas) y en presencia del análogo tóxico 8-azaguanina. Como controles se incluyeron las cepas: i) ΔZAC : carece de los genes que codifican para los tres principales transportadores de purinas, por lo que es incapaz de crecer en presencia de éstas como fuente de nitrógeno; ii) $\Delta ZAC::phZwt$; expresa el transportador PhZ en su versión silvestre y por tanto es capaz de crecer usando hipoxantina, adenina y guanina, no es capaz de crecer usando ácido úrico o xantina y es sensible a la 8-azaguanina; y iii) $\Delta ZAC::azgA$: igual a la anterior, pero expresa AzgA. A nivel fenotípico las diferencias entre estas cepas se encuentran en que la hipoxantina y 8-azaguanina se transportan más eficientemente a través de AzgA, reflejándose en que la cepa $\Delta ZAC::phZwt$ crece menos en hipoxantina y más en 8-azaguanina que la cepa $\Delta ZAC::azgA$. Todas las cepas evaluadas, tanto controles como mutantes, son variantes de la cepa ΔZAC diferenciándose únicamente en el transportador que expresan.

La Figura 2-8 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Ninguno de los mutantes adquirió la capacidad de crecer en ácido úrico o xantina y todos presentaron resistencia al oxipurinol, otro análogo tóxico que no es transportado por PhZ ni AzgA (sí por PhU y UapA). Algunos de los mutantes mostraron diferencias en el crecimiento en hipoxantina y 8-azaguanina respecto al control que expresa PhZ silvestre.

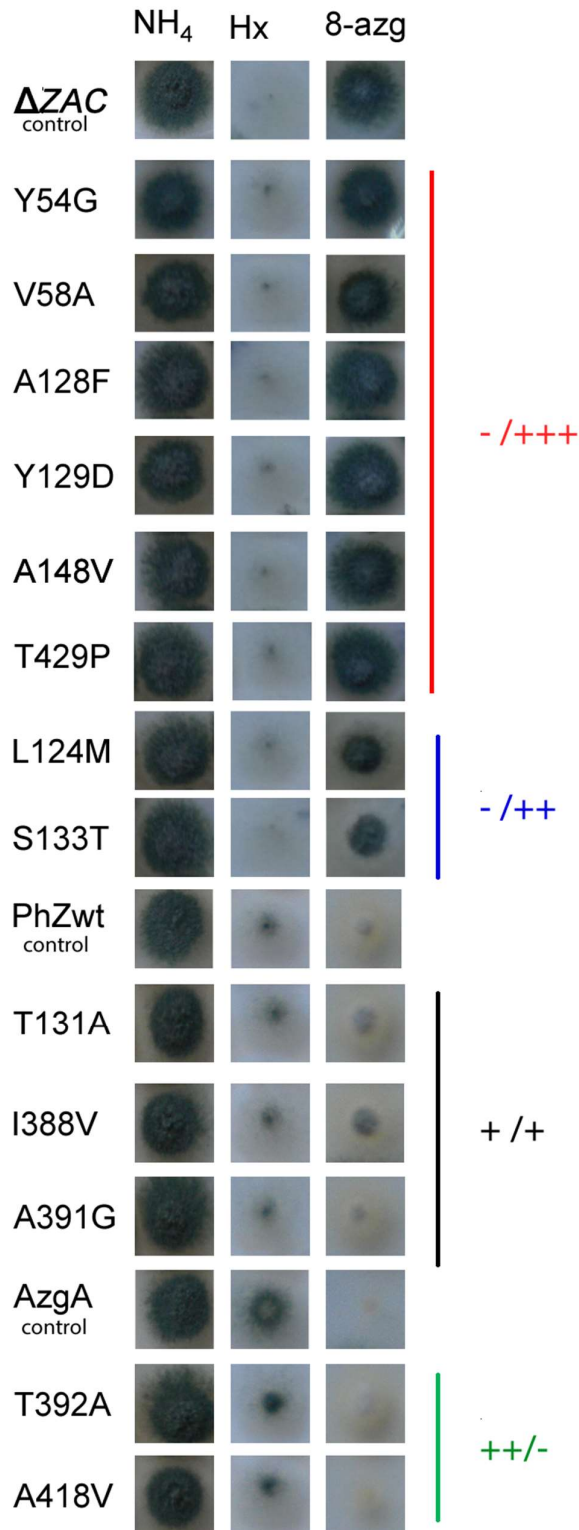


Figura 2-8: Análisis de crecimiento de mutantes PhZ. Se muestra el crecimiento en amonio (NH₄), hipoxantina (Hx) y 8-azaguanina + amonio (0,8 mM) (8-azg) a 37°C por 48 hs. Todos los medios fueron suplementados con p-aminobenzoico, piridoxina y/o riboflavina, según las auxotrofias de cada cepa (ver Sección 6.1). Como controles se incluyeron las cepas: Δ azgA Δ uapA Δ uapC (Δ ZAC), Δ ZAC::phZ (PhZ:wt) y Δ ZAC::azgA (AzgA). Los resultados obtenidos en adenina y guanina fueron omitidos por ser equivalentes a los que se muestran en hipoxantina. Los mutantes evaluados se muestran agrupados en 4 grupos según su fenotipo de crecimiento en hipoxantina/8-azaguanina, denominados -/+++ (rojo); -/++ (azul); +/+ (negro), y +++/- (verde).

Análisis de PhZ

A partir de los resultados obtenidos, los mutantes evaluados fueron agrupados en 4 grupos fenotípicos: i) aquellos que mostraron un fenotipo equivalente a la cepa ΔZAC : Y54G, V58A, A128F, Y129D, A148V y T429P (fenotipo -/+); ii) los mutantes L124M y S133T que mostraron un fenotipo intermedio entre las cepas ΔZAC y $\Delta ZAC::phZwt$ (fenotipo -/+); iii) los mutantes que mostraron un crecimiento equivalente a la cepa que expresa PhZ silvestre: T131A, I388V y A391G (fenotipo +/-); y iv) T392A y A418V que en hipoxantina pueden crecer más que el control que expresa PhZ silvestre y en el tóxico 8-azaguanina crecen menos (fenotipo +/-) (Figura 2-8). Estos resultados sugieren que las mutaciones evaluadas en el primer grupo provocan que el transportador pierda su capacidad de transporte; las mutaciones L124M y S133T reducirían la actividad de transporte; las mutaciones del tercer grupo no provocarían variaciones respecto a la proteína silvestre; y las mutaciones T392A y A418V podrían modificar la eficiencia con la que se transportan los sustratos (en particular la 8-azaguanina).

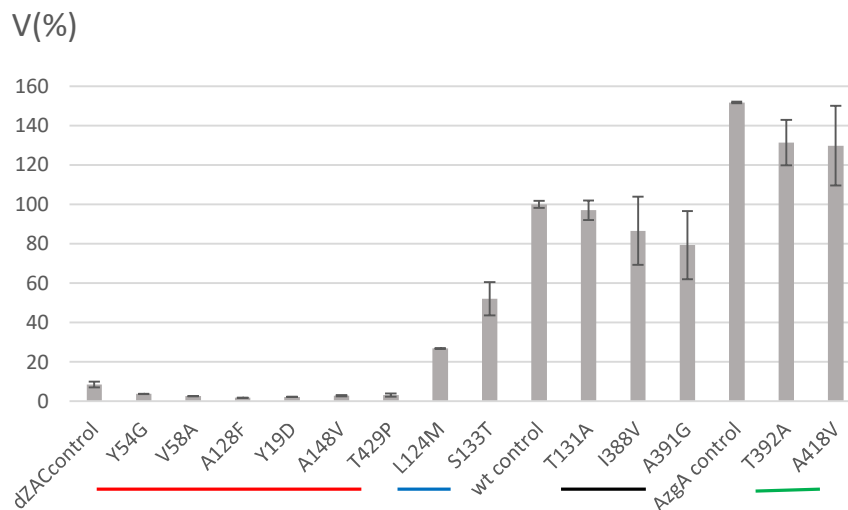


Figura 2-9: Velocidad inicial de transporte de ^3H -hipoxantina en mutantes de PhZ y cepas controles: $\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC$ (dZAC), $\Delta ZAC::phZ$ (wt) y $\Delta ZAC::azgA$ (AzgA). 100% se considera como la tasa de transporte en la cepa que expresa PhZ silvestre. Los resultados son el promedio de por lo menos tres experimentos independientes, cada uno medido por triplicado. En todos los casos la desviación estándar fue $<20\%$. En rojo se marcan los mutantes con los que se obtuvo una medida equivalente a la obtenida con la cepa ΔZAC , en azul los mutantes que tienen la captación disminuida respecto a PhZ silvestre, en negro los que su captación es equivalente a PhZ silvestre y en verde los que su captación de hipoxantina es superior a la de PhZ silvestre.

Como medida cuantitativa del transporte se realizaron ensayos de transporte (determinando V, la tasa de transporte inicial) con hipoxantina marcada radioactivamente (^3H -hipoxantina) en todas las cepas mutantes y controles. Los resultados de este análisis (Figura 2-9) concuerdan con los obtenidos mediante análisis de crecimiento y los mutantes nuevamente se pueden agrupar en cuatro grupos. El primer grupo conformado

por: Y54G, V58A, A128F, Y129D, A148V y T429P muestra una tasa de transporte de hipoxantina que puede considerarse despreciable ya que es equivalente a la de la cepa ΔZAC, considerado como ruido de fondo. En el segundo grupo se encuentran los mutantes L124M y S133T que presentan una disminución del transporte de aproximadamente 70% y 50%, respectivamente. Los mutantes T131A, I388V y A391G no presentaron diferencia significativa con respecto al transportador silvestre. Por último, T392A y A418V mostraron una tasa de captación de hipoxantina mayor a PhZ silvestre y equivalente a la del transportador AzgA.

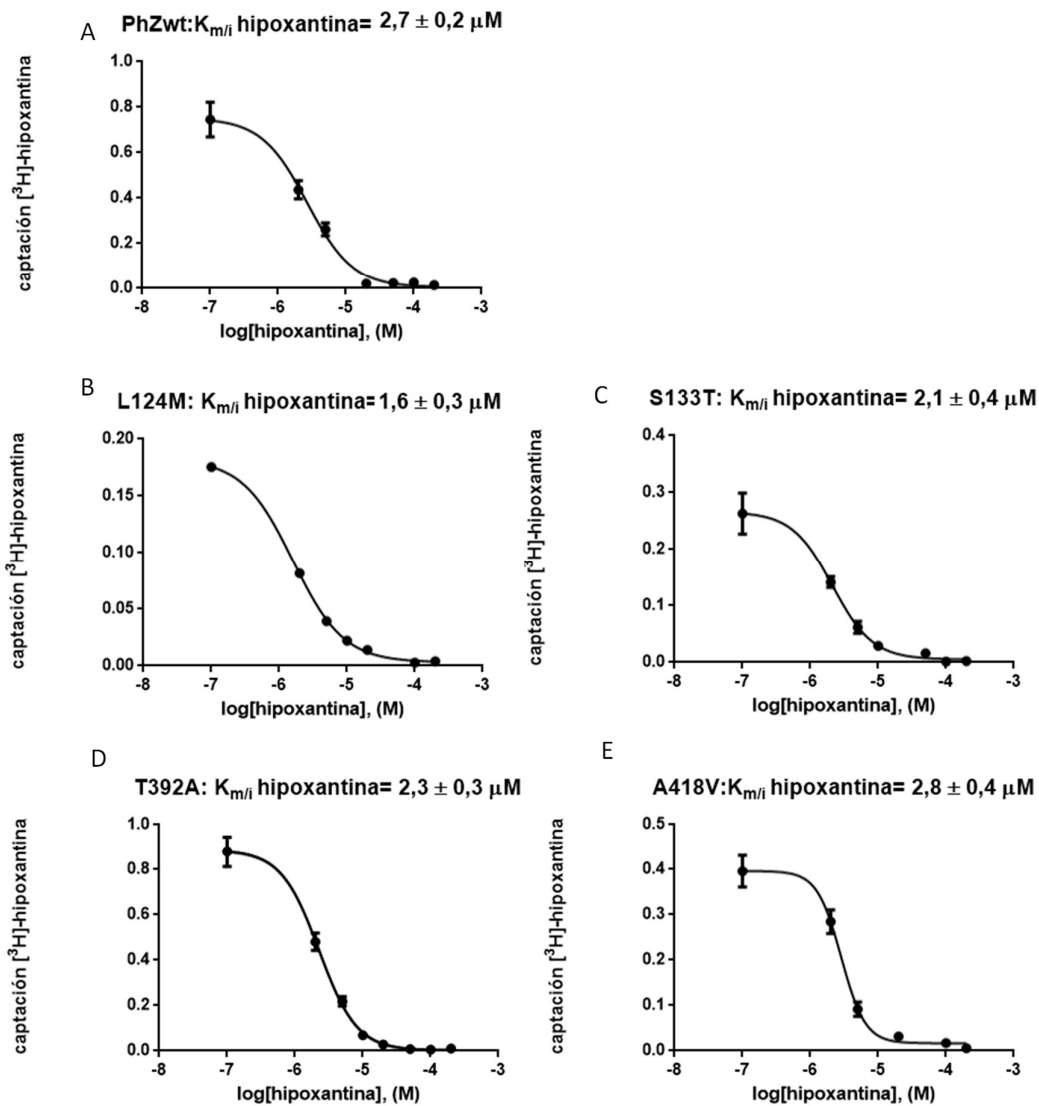


Figura 2-10: Caracterización cinética de mutantes PhZ: Se muestran las curvas de dosis respuesta para hipoxantina. La captación de $[^3\text{H}]$ -hipoxantina fue medida en presencia de concentraciones crecientes de hipoxantina no marcada (0,1-1 mM). El valor de $K_{m/i}$ se determinó como se describe en la Sección 6.5.6. Las gráficas muestran el promedio de por lo menos dos experimentos independientes, en los cuales se realizó triplicado para cada concentración. La desviación estándar fue $<20\%$ en todos los casos. Se muestran los datos para PhZ silvestre en A, y para los mutantes L124M (B), S133T (C), T392A (D) y A418V (E).

Análisis de PhZ

A todos los mutantes que presentaron diferencias de transporte con respecto a PhZ silvestre (L124M, S133T, T392A y A418V) se les determinó la $K_{m/i}$ de hipoxantina (Figura 2-10). Ninguno mostró variaciones significativas respecto al valor de $K_{m/i}$ de PhZ silvestre. El único mutante que presentó un valor de $K_{m/i}$ levemente inferior fue L124M. Por lo que si bien este mutante tiene menor capacidad de transporte de hipoxantina tendría una afinidad por la misma ligeramente aumentada respecto a PhZ silvestre.

2.3.5 Perfil de sustratos en mutantes PhZ

Una buena aproximación para elucidar el perfil de sustratos de un transportador, implica evaluar la capacidad de otras purinas de competir con el transporte de un sustrato previamente demostrado (en este caso ^3H -hipoxantina). Si bien es un método indirecto que en algunos casos requiere ser verificado por la medida directa, tiene la ventaja de que con un único sustrato marcado se pueden descartar aquellos sustratos que no compitan.

De esta manera se evaluó la capacidad de adenina, guanina, purina, 8-azaguanina, ácido úrico y xantina de competir con el transporte de ^3H -hipoxantina, en todos los mutantes que presentaron actividad de transporte de hipoxantina detectable (L124M, T131A, S133T, I388V, A391G, T392A y A418V, Figura 2-11).

Generalmente, en las condiciones de estos ensayos con los sustratos que no son transportados, se obtiene un porcentaje de captación del sustrato marcado mayor al 50% y con los sustratos que son transportados al nivel del sustrato marcado se obtiene un porcentaje de captación de ~1-5% (Kryptou & Diallinas, 2014). Los resultados obtenidos muestran que en los mutantes que no presentan diferencias de transporte con PhZ silvestre tampoco se encontraron diferencias en la competencia por el transporte de ^3H -hipoxantina por los sustratos evaluados.

Al comparar PhZ con AzgA (Figura 2-12) se observa que el transportador de *P. chrysosporium* presenta mayor inhibición de transporte de ^3H -hipoxantina en presencia de guanina, ácido úrico y xantina que el transportador de *A. nidulans* y menor inhibición por el tóxico 8-azaguanina.

Análisis de PhZ

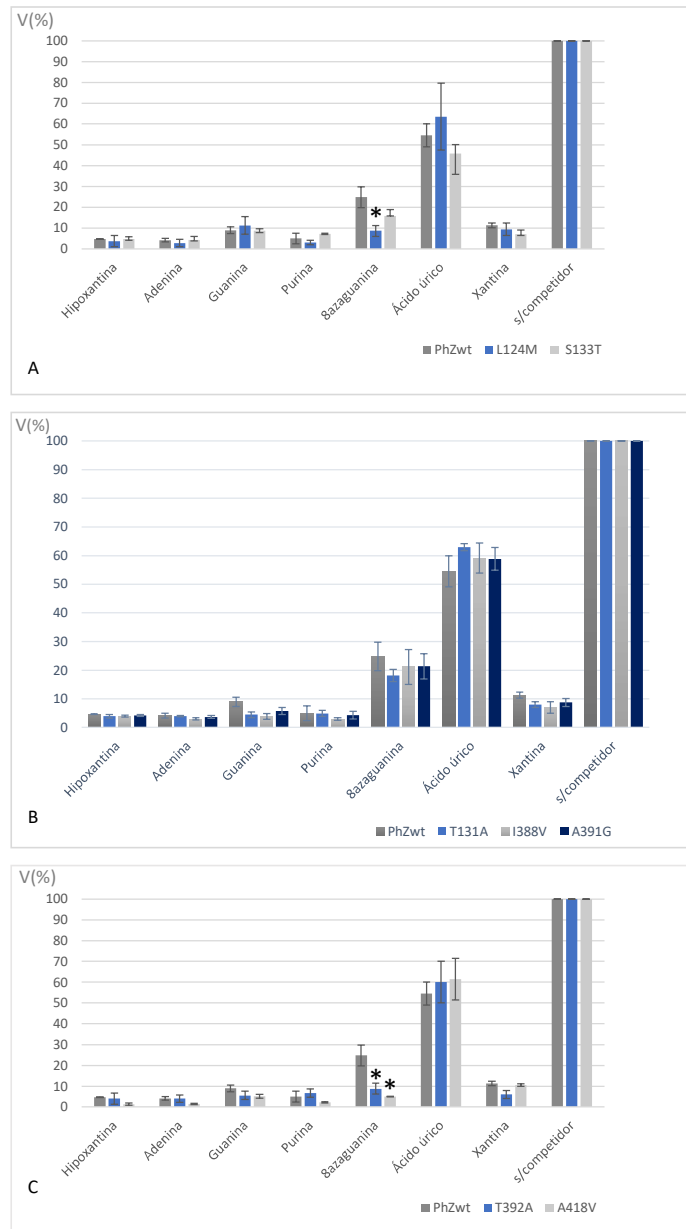


Figura 2-11: Ensayos de transporte de $[^3\text{H}]$ -hipoxantina en mutantes PhZ en presencia de otros sustratos no marcados: Se muestran los gráficos del porcentaje de velocidad inicial de transporte de ^3H -hipoxantina en presencia de 1 mM de los sustratos competidores que se indican en el gráfico. Como 100% se indica el transporte obtenido en ausencia de sustrato competidor (ver Sección 6.5.6). Como control se incluyó la competencia con hipoxantina sin marcar, cuyo porcentaje de inhibición es máximo (~95-99%). Los gráficos muestran el promedio de por lo menos dos experimentos independientes, en los cuáles se realizó triplicado para cada punto. La desviación estándar fue $<20\%$ en todos los casos. En A se muestran los datos de T131A, I388V y A391G comparado con PhZ silvestre. En B se muestran los datos de L124M y S133T comparado con PhZ silvestre. En C se muestran los datos de T392A y A418V comparado con PhZ silvestre. Con * se marcan los valores que presentaron diferencias significativas respecto a PhZ silvestre.

El transporte de ^3H -hipoxantina en los mutantes T131A, I388V y A391G presenta un porcentaje de inhibición similar al de PhZ silvestre en presencia de adenina, guanina,

Análisis de PhZ

purina, 8-azaguanina (Figura 2-11). Con los mutantes L124M y S133T (que muestran una menor eficiencia de transporte de hipoxantina) se observa que todos los sustratos inhiben la captación de ^3H -hipoxantina al nivel de PhZ excepto la 8-azaguanina donde L124M, presentan un mayor porcentaje de inhibición (Figura 2-11). Este resultado indica que esta sustitución produce un aumento en la competencia del tóxico 8-azaguanina por la unión a PhZ. Un resultado similar se obtiene con T392A y A418V (Figura 2-11). Estos resultados, y los observados en el análisis de crecimiento en placa (Figura 2-8) indican que los residuos L124, T392 y A418 tendrían un rol en el transporte cuando el sustrato es 8-azaguanina.

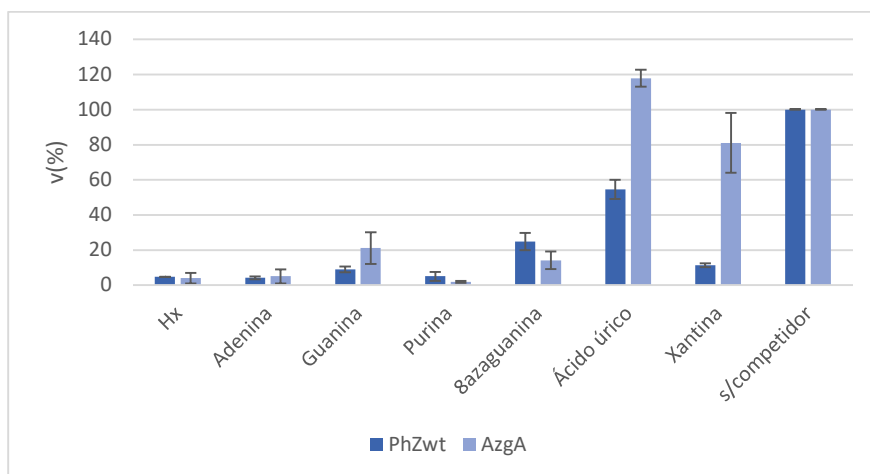


Figura 2-12: Ensayos de transporte de ^3H -hipoxantina en PhZ vs AzgA: Se muestran los gráficos del porcentaje de velocidad inicial de transporte de ^3H -hipoxantina en presencia de 1 mM de los sustratos competidores que se indican en el gráfico. Como 100% se indica el transporte obtenido en ausencia de sustrato competidor (ver Sección 6.5.6). Como control se incluyó la competencia con hipoxantina cuyo porcentaje de inhibición es máximo (~95-99%). Los gráficos muestran el promedio de por lo menos dos experimentos independientes, en los cuáles se realizó triplicado para cada punto. La desviación estándar fue <20% en todos los casos.

Respecto a la xantina, PhZ silvestre y todos los mutantes muestran un grado de inhibición superior a la proteína AzgA. Con estos resultados se podría pensar que PhZ a diferencia de AzgA transporta esta purina pero las cepas que expresan el transportador de *P. chrysosporium* no son capaces de crecer utilizando xantina como fuente de nitrógeno. A modo de corroboración se realizaron ensayos de captación de ^3H -xantina, en los cuales no se detectó transporte, por lo que la inhibición que se obtiene con xantina se debe a que este sustrato compite muy bien con la hipoxantina por la unión a PhZ aunque no puede ser transportado.

2.3.6 Expresión y localización de versiones mutantes de PhZ

Las diferencias observadas en las tasas de transporte y en los ensayos de crecimiento en placa podrían implicar problemas en: el tráfico hacia la membrana plasmática, aumento en la tasa de recambio proteico, un verdadero aumento o disminución en la actividad de transporte de PhZ, o un defecto en la síntesis de las versiones mutantes de PhZ. Para distinguir entre estas posibilidades se realizaron análisis de localización subcelular mediante la observación microscópica de la proteína verde fluorescente, y *western blots* con anticuerpos anti-GFP y anti-actina (para la detección de actina como control de carga).

Es importante destacar que la versión silvestre de PhZ, además de localizarse en la membrana y en vacuolas, puede observarse en anillos citoplasmáticos, que se corresponderían con el RE (Barraco-Vega et al., 2017).

Los análisis de microscopía de fluorescencia (Figura 2-13) revelaron que la mayoría de los mutantes muestran una localización similar a la versión silvestre. Mientras que, de los 6 mutantes que mostraron un fenotipo de ausencia de transporte (equivalente a cepa Δ ZAC) en los ensayos de crecimiento y captación de hipoxantina, solo PhZ_V58A es capaz de alcanzar la membrana plasmática. En los otros 5 mutantes (Y54G, A128F, Y129D, A148V y T429P) no se observa fluorescencia en la membrana, sino que la proteína aparece localizada principalmente en vacuolas. En el caso de Y54G también se observa que gran parte de la proteína queda retenida en los anillos que se corresponderían con el RE. Estos resultados indicarían que el residuo sustituido en estos cinco mutantes tiene un efecto sobre el plegamiento, lo que evitaría que la proteína alcance su sitio de acción, la membrana plasmática.

Para todos los demás residuos, su sustitución no afecta la localización en la membrana plasmática significativamente. Sólo en el mutante S133T se puede observar que la cantidad de proteína asociada a vacuolas aumenta levemente respecto a la localizada en la membrana plasmática. Con el fin de determinar si los fenotipos observados en los mutantes que mostraron una localización similar a PhZ silvestre (L124M, T131A, S133T, I388V, A391G, T392A, A418V y V58A) se correspondían a cambios en la cantidad de proteína expresada y/o en su estabilidad proteica, se evaluaron estos parámetros por

Análisis de PhZ

western blot. Es importante mencionar que en esta técnica es normal observar una banda correspondiente a la fusión PhZ-GFP y otra correspondiente a la GFP libre, ya que la GFP es refractaria a la proteólisis (Chiang et al., 2001). Por otra parte, la detección de GFP libre es una medida indirecta estándar de la degradación vacuolar de proteínas de membrana fusionadas a GFP (Pinar et al., 2013; Shintani & Klionsky, 2004).

Los resultados muestran que en la mayoría de los mutantes el nivel proteico es similar o con muy pocas diferencias respecto a PhZ silvestre (Figura 2-14). Los mutantes T131A y T392A presentan niveles de expresión de PhZ significativamente diferentes al silvestre (tomando en cuenta la señal de la banda correspondiente a la actina, utilizada como control de carga). En el caso del mutante T131A, éste presenta un nivel de proteína disminuido, ya que la banda correspondiente a PhZ-GFP es significativamente menos intensa que la del silvestre (y no se observa GFP libre). Por el contrario, T392A presenta un mayor nivel proteico, ya que la banda correspondiente a PhZ-GFP es significativamente más intensa que la del silvestre. Cabe señalar que en el caso del mutante I388V también se observa una banda de PhZ-GFP que es más intensa que la del silvestre pero, al tomar en cuenta la intensidad de la actina, se consideró el nivel proteína semejante al de PhZ silvestre.

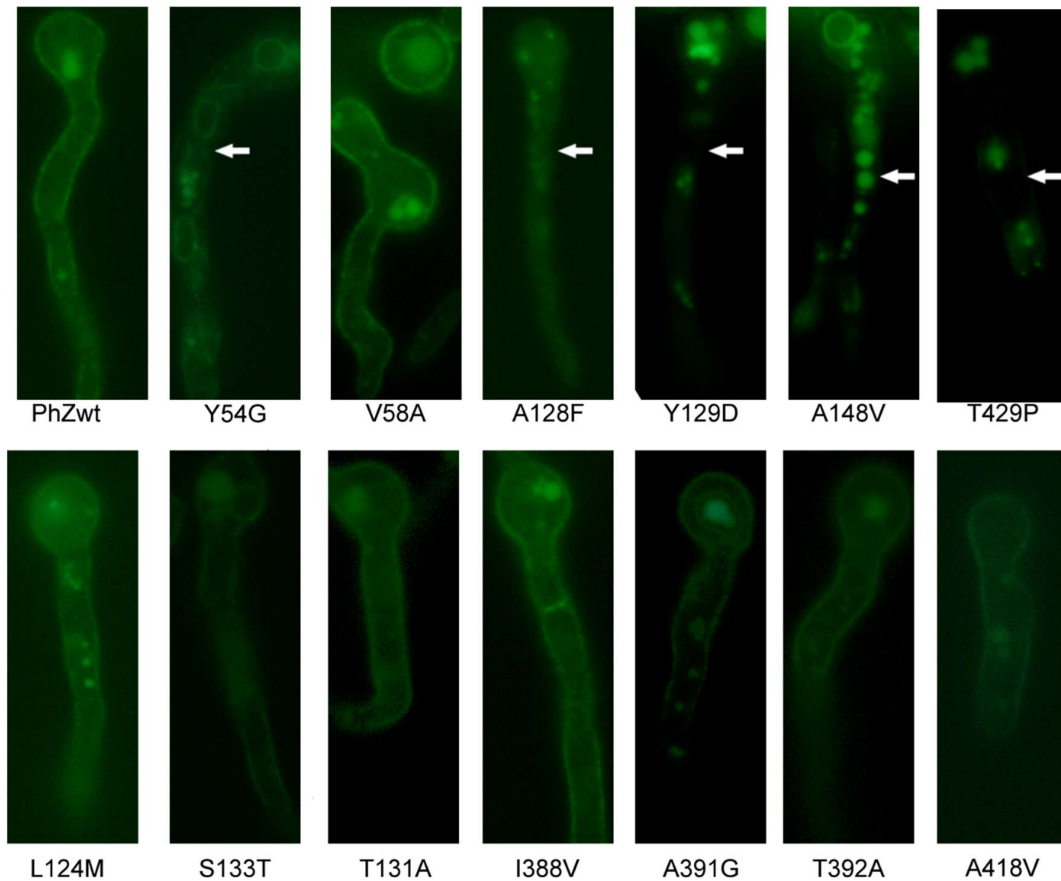


Figura 2-13: Localización subcelular *in vivo* de mutantes de PhZ por microscopía de epifluorescencia. Como control se incluyó la cepa $\Delta ZAC::phZ$ (PhZwt) que también expresa el transportador fusionado a la proteína verde fluorescente. En el control se observa fluorescencia en membrana, vacuolas y anillos citoplasmáticos que se corresponderían con el RE (patrón ya determinado en Barraco et al. 2017). Para cada mutante se analizaron 10-15 campos, para todos los casos se observó un mismo comportamiento, seleccionando por lo tanto una imagen representativa. Las flechas indican la ausencia de fluorescencia a nivel de la membrana.

Con respecto a la estabilidad proteica de los distintos mutantes analizados, la GFP libre es significativamente menos intensa en los mutantes T131A e I388V y más intensa en S133T y T392A. Si bien es difícil de determinar cualitativamente, consideramos que en el caso de T131A y T392 la diferencia en la cantidad de GFP libre respecto al silvestre se debe al nivel proteico (T131A: menor y T391: mayor). En el mutante S133T consideramos que la intensidad de GFP libre es consecuencia de un mayor nivel de degradación proteica y en el caso de I388V que la proteína mutante tiene menor degradación que PhZ silvestre. Por lo tanto, los mutantes que presentan diferencias de estabilidad respecto a PhZ silvestre son S133T e I388V.

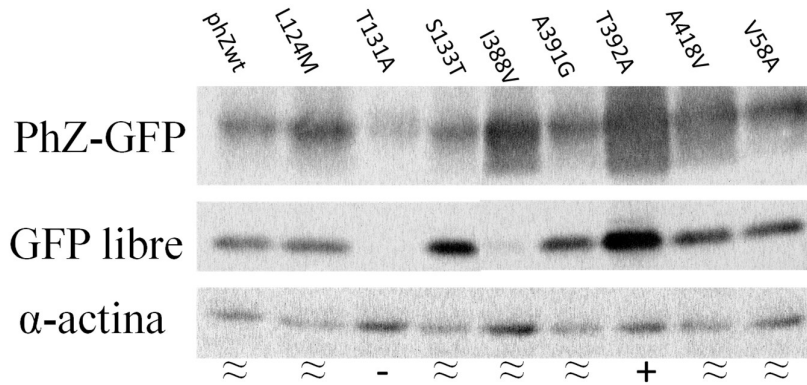


Figura 2-14: Western blot de proteínas totales de mutantes PhZ-GFP. Como control se incluyó la cepa *AZAC::phZ* (PhZwt) que también expresa el transportador fusionado a la proteína verde fluorescente. En todos los casos se cargaron 50 μ g de proteínas totales, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con anticuerpos monoclonales anti-GFP y anti-actina (está último como control de carga). Debajo de la figura se indica cualitativamente la relación PhZ-GFP/actina, se indica con \approx todos aquellos carriles que presentan un nivel semejante al silvestre, con - donde el nivel de PhZ es significativamente menor y con + donde el nivel es significativamente mayor al del carril PhZwt.

2.3.7 Modelado del transportador PhZ

Para correlacionar los resultados obtenidos mediante el análisis mutacional con la estructura de PhZ se planteó la construcción de un modelo tridimensional de PhZ. El primer modelo fue realizado por homología en base a la estructura cristalográfica de UapA (ver Sección 2.3.2) por ser la única estructura cristalina fúngica de esta “superfamilia” disponible. La metodología de modelado por homología está fuertemente limitada por el porcentaje de identidad que en el caso de UapA y PhZ es bajo (16 % identidad, 50% similaridad). Por lo tanto, antes de avanzar en el análisis de la estructura, se decidió hacer un nuevo modelo de PhZ con refinado mediante dinámica molecular y posteriormente validar los resultados obtenidos mediante técnicas bioinformáticas que identifiquen residuos próximos en la estructura modelada.

La búsqueda de *templates* para el nuevo modelo se realizó mediante la base de datos del SWISS-PROT seleccionando como candidatos todos aquellos que presentarán un valor de cobertura mayor a 0,6. Nuevamente se seleccionó UapA como proteína molde por ser la proteína cristalizada con mejores valores de cobertura e identidad respecto a PhZ, además de ser una proteína fúngica con similaridad funcional.

Para obtener el mejor alineamiento, las secuencias de PhZ y UapA, fueron alineadas mediante 4 programas: Blast, HHBlit, Aligme (específico para proteínas de membrana) y Sspred (Khafizov et al., 2010; Stamm et al., 2013, 2014) y posteriormente corregidas

Análisis de PhZ

manualmente. En el alineamiento utilizado para el modelo (Figura 2-15) se puede ver que la región N-terminal de PhZ (hasta G35), al igual que la región desde R493 hasta el extremo C-terminal, no tienen una porción análoga en UapA, por lo que estas regiones no fueron consideradas en el modelo. Otras tres regiones (G68-L85; Y222-N229 y F297-N312) tampoco tienen una región análoga en el alineamiento por lo que fueron modeladas mediante modelado *ab-initio* (ver Sección 6.7.3).

El 10% de los modelos que mejor puntuaron en relación a las restricciones espaciales del programa Modeller (menor energía potencial) fueron luego ordenados según la función de GA341 y QMEANBrane, especialmente diseñada para proteínas de membrana (Melo & Sali, 2007; Studer et al., 2014). Se seleccionaron los 9 mejores modelos y se realizó el refinamiento de *loops* en función de la energía potencial de cada residuo y comparación con el *template*. Se seleccionó el modelo de menor energía potencial, el cual fue posteriormente refinado por dinámicas moleculares. Las simulaciones mostraron que la estructura fue estable en el tiempo (500 ns).

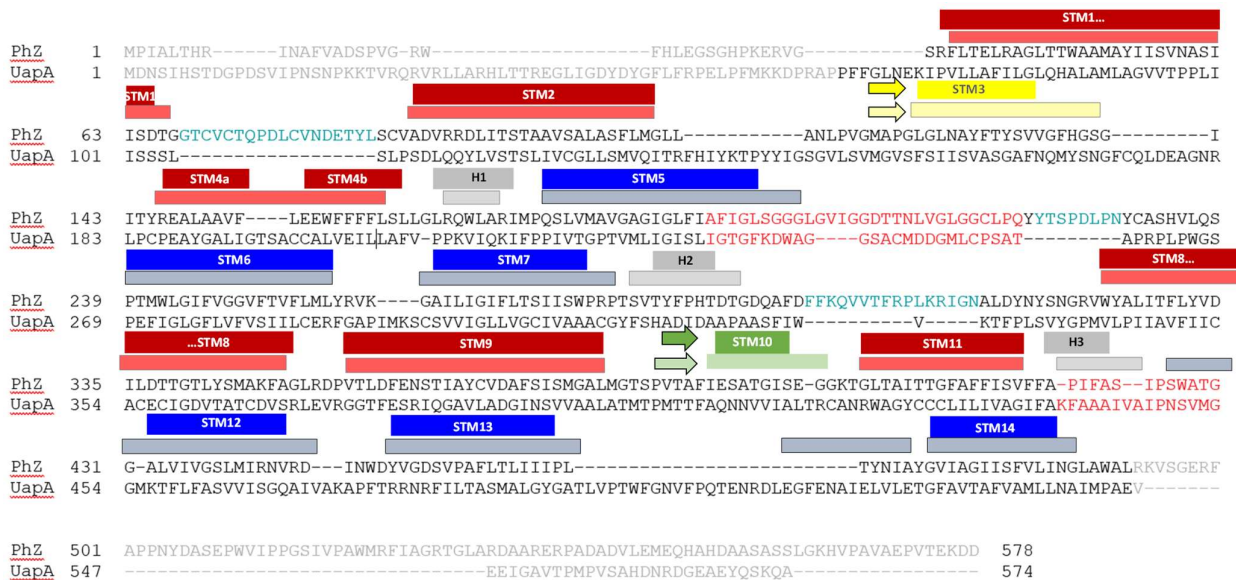


Figura 2-15: Alineamiento de PhZ vs UapA utilizado para el modelado. Las regiones comprendidas entre A192-Q220 y P419-G430 (secuencias en rojo) fueron modificadas manualmente. En gris se marcan las regiones de secuencia que no fueron consideradas en el modelo y en celeste las regiones que fueron modeladas mediante la técnica de *ab-initio* (G68-L85; Y222-N229 y F297-N312). Sobre el alineamiento se esquematiza la estructura secundaria propuesta para PhZ, según el modelo tridimensional realizado en este trabajo. En colores oscuros y en colores claros se muestra la estructura propuesta para el cristal de UapA (Alguel et al., 2016). Los segmentos transmembrana (STM) se representan mediante rectángulos rojos y azules, las hojas β mediante flechas y las hélices internas mediante rectángulos grises (sin borde). Según el modelo planteado la proteína se dispone en dos dominios, un dominio flexible denominado entrada, cuyos STM se represen en azul y un dominio compacto denominado núcleo cuyos STM se representan en rojo. En amarillo y verde se marcan los segmentos que forman el motivo β antiparalelo.

El modelo obtenido propone una estructura tridimensional de PhZ que consiste en 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas y un motivo β antiparalelo formado por una hoja β próxima al STM3 y otra próxima al STM10 (Figura 2-15 y Figura 2-16). El modelo se corresponde con una conformación ocluida hacia el citoplasma. La estructura proteica queda topológicamente dividida en dos dominios, formados por dos repetidos invertidos. El dominio denominado núcleo involucra 8 STM y está formado por los STM1-4 y STM8-11 y el denominado entrada involucra 6 STM y está formado por los STM5-7 y STM12-14.

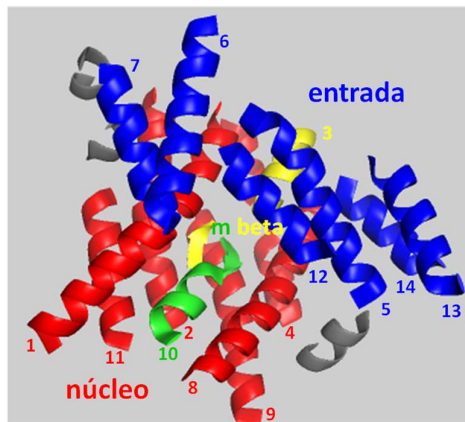


Figura 2-16: Modelo de PhZ. Representación esquemática de la estructura tridimensional obtenida mediante modelado por homología con UapA como molde. En rojo se representan los STM que constituyen el dominio denominado núcleo y en azul se representan los STM del dominio denominado entrada. En verde y amarillo se representa las hojas β y STM que forman el motivo β antiparalelo. Los STM se representan mediante cintas (la numeración se indica en la figura). En gris se marcan las hélices internas. Las hojas β se representan mediante flechas. En amarillo y verde se indica en motivo beta antiparalelo. Para la figura se omitieron los *loops* entre los STM.

Mediante el análisis del perfil electrostático se observó que la distribución de los residuos ionizados en la superficie de la proteína es bastante razonable: la mayoría se colocan en el lado citoplasmático o lado extracelular o a lo largo del poro de la proteína en el interior de ésta. En el lado exterior se observa una distribución levemente negativa, el lado citoplasmático se observa cargado positivamente y la región intermedia es neutral, consistente con la posición en la bicapa lipídica. Se puede observar un “parche” fuertemente negativo en la zona interior comprendida entre los STM8, STM5 y hélice interna 1, que formaría parte del poro de la proteína (Figura 2-17).

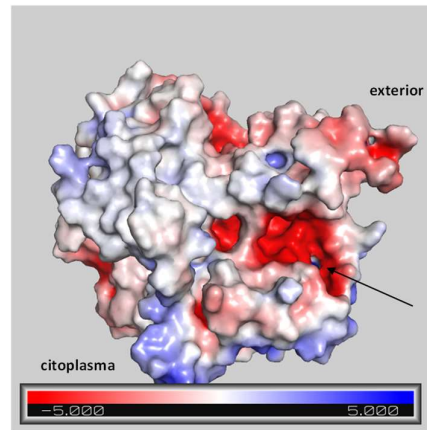


Figura 2-17: Perfil electrostático de PhZ. Con una flecha se marca una zona de color rojo intenso de carga negativa que formaría parte del poro de la proteína.

La estructura de PhZ propuesta por el modelo es, en términos generales, similar a la estructura tridimensional deducida para UapA, sin embargo presenta las siguientes diferencias: i) la longitud de los STM y hélices internas, en general son más cortos en PhZ que UapA; ii) el STM4 en PhZ se encuentra dividido en dos segmentos, uno de 8 residuos (R146-F153) y otro de 9 residuos (E155-S163) mientras que en UapA este segmento es una hélice transmembrana entera de 16 residuos (P186-L201); y iii) el STM14 en PhZ es un único segmento de 12 residuos (G471-G485) mientras que en UapA es una hélice discontinua formada por dos segmentos (Figura 2-15).

Como una forma de validar el modelo propuesto se utilizaron técnicas bioinformáticas que permiten identificar residuos próximos en su estructura tridimensional. Para ello se buscaron variantes correlacionadas de los residuos de PhZ en un alineamiento de múltiples secuencias. En estos estudios la interacción entre residuos está representada por una alta correlación entre las dos posiciones en la secuencia. Al analizar el mapa de variantes altamente correlacionadas (Figura 2-18) se puede ver que aquellas que involucran dos residuos cercanos en estructura primaria se localizan en la diagonal del mapa (cerca del borde con la zona gris) y no son muy informativas para comprender la estructura tridimensional de la proteína. En cambio, se observan varios pares correlacionados entre la zona amino y carboxilo terminal de la secuencia de PhZ que señalan una posible interacción entre los residuos de la zona ~20 a ~110 con los residuos de la zona ~360 a ~410. En la estructura planteada por el modelo se corroboran estas interacciones: la primera zona está comprendida por STM1-STM2 y la segunda por STM9-STM10-STM11. El STM11 está ubicado entre el STM1 y STM2, varios residuos

Análisis de PhZ

de STM1 se ubican a distancia de enlace de residuos del STM10 y varios del STM2 podrían interactuar con residuos del STM9. Aunque estos datos no adicionan información a la estructura propuesta, dada la poca identidad que existe entre PhZ y la proteína utilizada como molde (UapA), el hecho de que los datos obtenidos con esta metodología (completamente independiente) se correlacionen con la estructura propuesta por el modelo es útil para validar la estructura planteada. Se analizaron las 60 variantes más correlacionadas (ordenadas según el puntaje de correlación) y se midió la distancia de los residuos en la estructura planteada por el modelo. Se observó que más de un 80% de los residuos correlacionados están a una distancia menor a 10 Å y todos los residuos que se encuentran a mayor distancia se localizan en *loops* sin estructura definida o en las regiones terminales de la proteína. En la tabla de la Figura 2-18 se detalla el análisis de los 20 pares con mayor puntaje de correlación, en la misma se puede ver que sólo el par L484-V250 queda a una distancia mayor a 20 Å (el residuo L484 se encuentra en el extremo C-terminal PhZ).

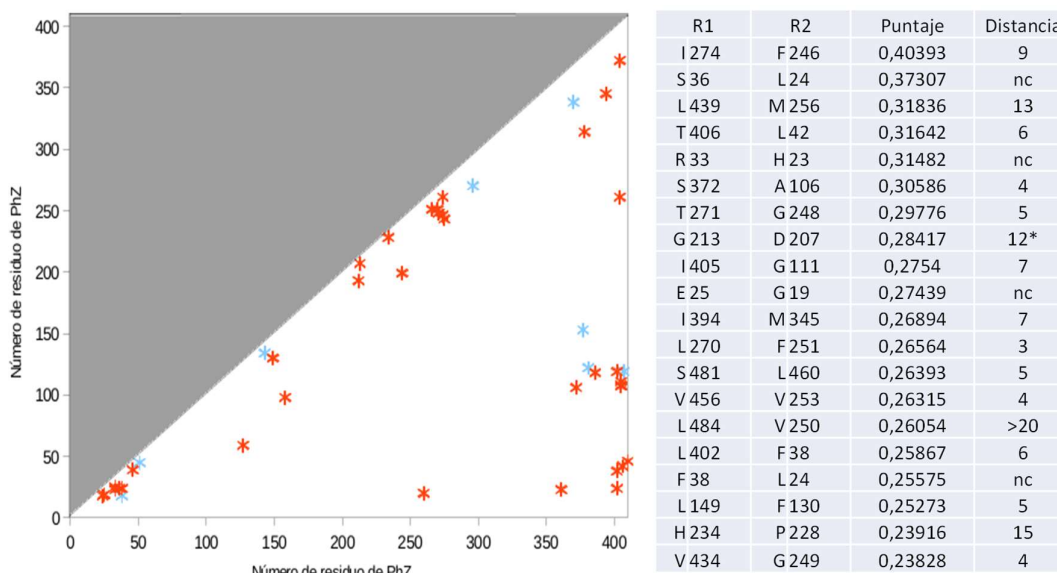


Figura 2-18: Mapa de variantes correlacionadas. Se muestran las 60 variantes más correlacionadas de PhZ ordenadas en base a su puntaje de correlación. Se omite la parte en gris, ya que es simétrica a la región en blanco. En rojo están indicadas las primeras 50 variantes (puntaje de correlación 0,40393-0,18379) y en azul las siguientes 10 (puntaje de correlación 0,18237-0,17367). En la tabla se indican las 20 variantes más correlacionadas con el respectivo puntaje de correlación y la distancia de los residuos medida en Å en la estructura tridimensional modelada. nc marca aquellas distancias que no pudieron ser medidas porque alguno de los residuos del par está localizado en la una región no incluida en la estructura modelada.

Con la estructura planteada por el modelo validado se procedió a indagar sobre el sitio de unión al sustrato. Para ello se abordaron aspectos del reconocimiento de sustratos mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*), utilizando el programa *Autodock tools*. Los sustratos hipoxantina y 8-azaguanina se acoplaron a la estructura modelada (ver Sección 6.7.5). Las diez mejores conformaciones generadas con cada sustrato fueron analizadas y ordenadas en base al criterio de energía de interacción.

Con hipoxantina las 9 conformaciones con menor energía (-4,25 a -4,19 kcal/mol) definieron el *cluster* mayoritario (*cluster* 1). El segundo *cluster* quedó representado por una única conformación (-4,2 kcal/mol, *cluster*2). Con 8-azaguanina las mejores conformaciones también quedaron agrupadas en dos *clusters*: el mayoritario representado por las 7 conformaciones de menor energía (-5,5 a -5,42 kcal/mol) y otro representado por 3 conformaciones (-5,38 a -5,31 kcal/mol, *cluster* 2) (Figura 2-19).

Los residuos de PhZ que participarían de la interacción con el sustrato se analizaron mediante el programa LigPlotplus para las conformaciones obtenidas para cada *cluster*, tanto con hipoxantina como con 8-azaguanina.

Con hipoxantina el análisis de las conformaciones del *cluster* 1 propone que los residuos que interaccionan con el sustrato formando enlaces de hidrógeno son D337, I388, E389 y R442. Con la conformación que definió el *cluster* 2 los residuos candidatos son P122, D337 y R442 (Figura 2-19). Con 8-azaguanina el análisis propone que los residuos que interaccionan con el sustrato formando enlaces de hidrógeno serían L124, D337, E389 y R442 (*cluster* 1) y P122 con D337 (*cluster* 2) (Figura 2-20).

Con ambos sustratos el análisis de las conformaciones del *cluster* mayoritario involucran cuatro residuos: tres de ellos coinciden (D337, E389 y R442) el cuarto es I388 cuando el sustrato es hipoxantina y L124 cuando el sustrato es 8-azaguanina. Con las conformaciones del segundo *cluster* hay dos residuos que se proponen con ambos sustratos (P122 y D337) y otro residuo que solo interaccionaría cuando el sustrato es hipoxantina (R442).

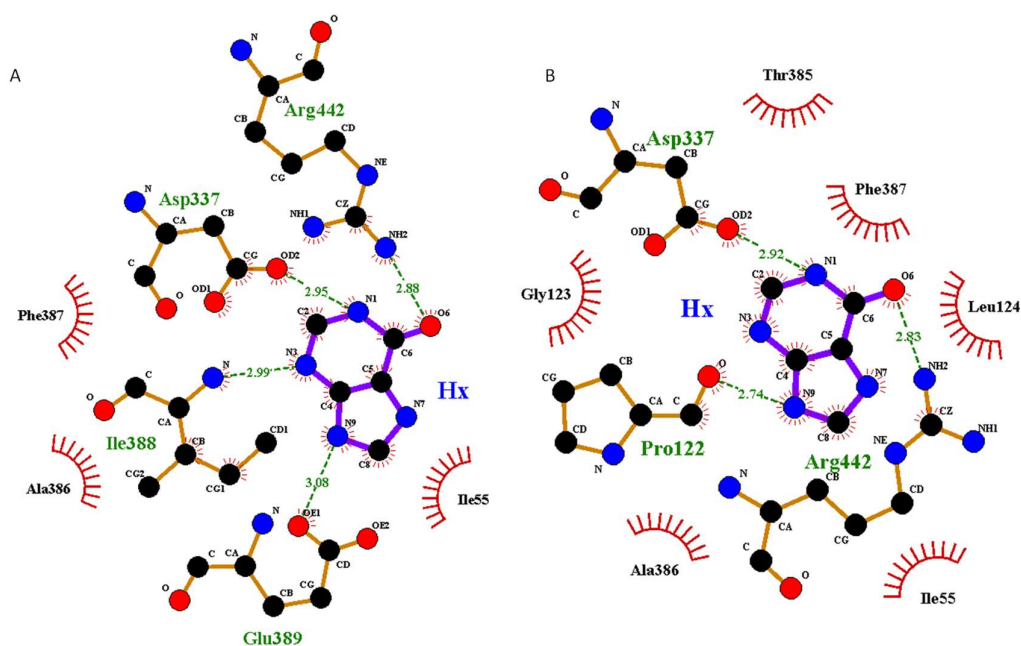


Figura 2-19: Interacción PhZ-hipoxantina. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de hipoxantina (Hx) que interaccionan con PhZ obtenidas mediante Autodock. A) *Cluster 1*, representado por 9 de 10 conformaciones con energía de interacción -4,25 a -4,19 kcal/mol B) *Cluster 2* representado por una conformación con -4,2 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rayadas rojas se representan otras interacciones.

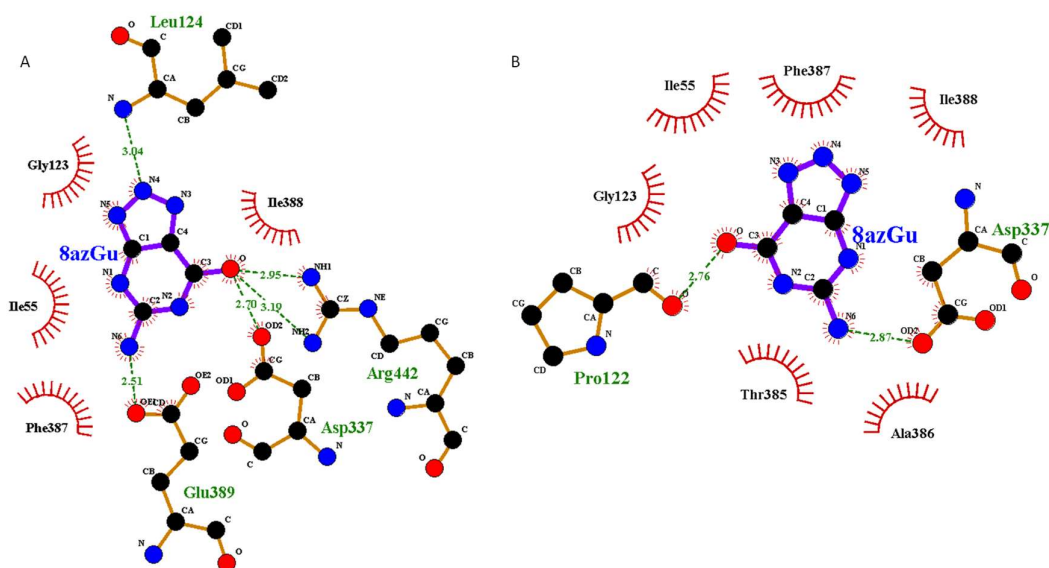


Figura 2-20: Interacción PhZ-8-azaguanina. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de 8-azaguanina (8azGu) que interaccionan con PhZ obtenidas mediante Autodock. A) *Cluster 1*, representado por 7 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,5 a -5,42 kcal/mol B) *Cluster 2* representado por tres conformaciones con -5,38 a -5,31 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rayadas rojas se representan otras interacciones.

Análisis de PhZ

Estos resultados proponen dos posibles orientaciones para la interacción PhZ-hipoxantina (Figura 2-21) y PhZ-8-azaguanina (Figura 2-22).

Según la orientación más favorable (desde el punto de vista de energía de interacción) PhZ interaccionaría con la hipoxantina a través de enlaces de hidrógeno mediados por las cadenas laterales de los residuos E389 (STM10), D337 (STM8) y R442 (STM12) y el grupo amino del esqueleto de I388 (STM10). Según el modelo propuesto estos residuos interaccionan con N1 (H), N3 (H) y C6=O del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol. Cuando el sustrato es 8-azaguanina E389, D337 y R442 interaccionan con N6 (H) y C3=O del anillo pirimidínico y la interacción de I388 se cambia por la del grupo amino del esqueleto de L124 (STM3) que interacciona con N4 del imidazol. Además, el anillo aromático de F387 (*loop* entre hoja beta y STM10) estabilizaría la interacción con los sustratos mediante interacción (débil) de apilamiento tipo π - π .

La otra orientación propuesta para ambos sustratos implica la interacción del grupo carbonilo de P122 (STM8) y la cadena lateral de D337 (STM10), agregándose la de la cadena lateral de R442 cuando el sustrato es hipoxantina. Según los modelos propuestos estos residuos forman enlaces de H con N1 (H) y C6=O del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol cuando de la hipoxantina. Cuando el sustrato es 8-azaguanina los enlaces se forman con N6 (H) y C3=O del anillo pirimidínico. En este caso también se formaría la interacción de apilamiento tipo π - π con F387.

Respecto a la localización de los 13 residuos analizados en este trabajo (Figura 2-23): i) dos se encuentran en STM1 (Y54, V58); ii) 5 en el STM3 (L124, A128, Y129, T131, S133); iii) uno es STM4 (A148); iv) tres en STM10 (I388, A391, T392), v) uno en la hélice interna entre el STM11 y STM12 (A418), y vi) uno en el *loop* entre STM11 y STM12 (T429). De esta forma 8 de los 13 residuos forman parte del motivo β antiparalelo. Entre ellos L124 e I388 son dos de los residuos que según el modelo planteado interaccionarían con 8-azaguanina e hipoxantina, respectivamente (Figura 2-22 A y Figura 2-21A).

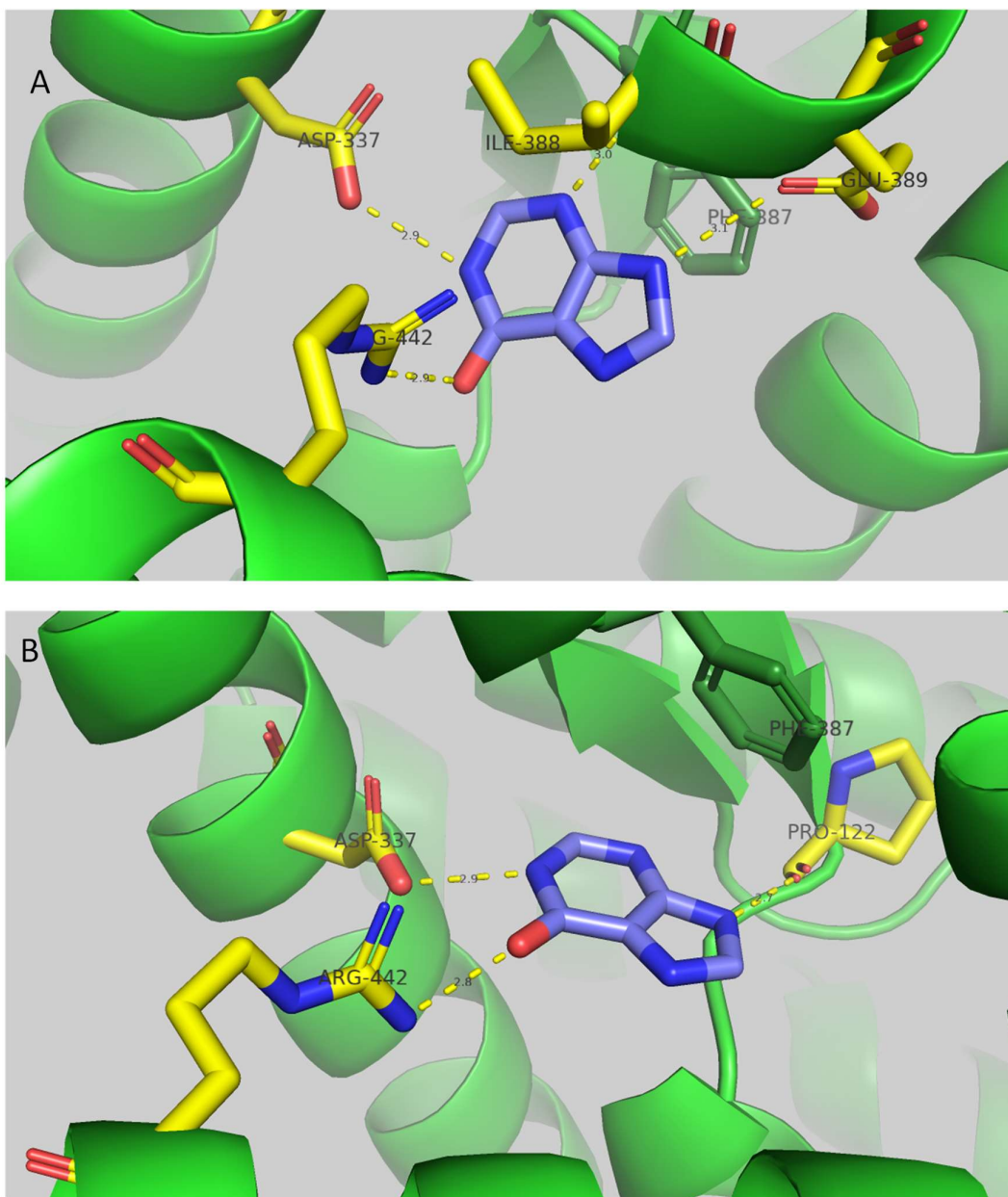


Figura 2-21: Interacción PhZ-hipoxantina. Obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*). En amarillo se marcan los residuos que interactúan con el sustrato mediante enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno se marcan mediante líneas punteadas amarillas, con la correspondiente distancia de enlace. Los residuos involucrados en otras interacciones se representan en verde. A) La disposición de la molécula de hipoxantina representa el *cluster 1*, definido por 9 de 10 conformaciones con energía de interacción -4,25 a -4,19 kcal/mol B) La disposición de la molécula de hipoxantina representada por la única conformación del *cluster2* con -4,2 kcal/mol de energía de interacción. Los STM se representan como cintas y las hojas β como flechas.

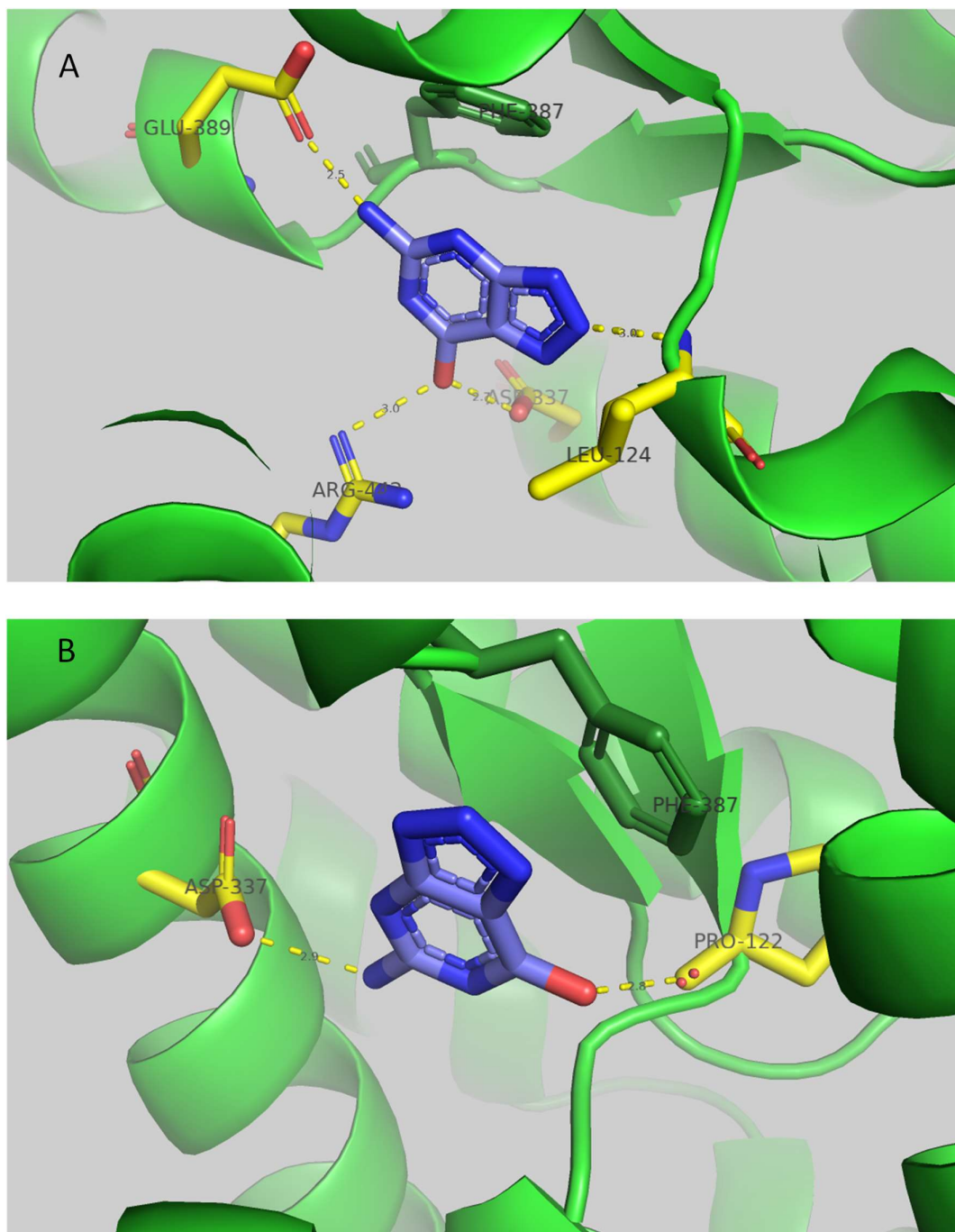


Figura 2-22: Interacción PhZ-8-azaguanina. Obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*). En amarillo se marcan los residuos que interaccionan con el sustrato mediante enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno se marcan mediante líneas punteadas amarillas, con la correspondiente distancia de enlace. Los residuos involucrados en otras interacciones se representan en verde. A) La disposición de la molécula de 8-azaguanina representa el *cluster* 1, definido por 7 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,5 a -5,42 kcal/mol B) La disposición de la molécula de hipoxantina representada por una conformación del *cluster*2, definido por 3 de 10 conformaciones con -5,38 a -5,31 kcal/mol de energía de interacción. Los STM se representan como cintas y las hojas β como flechas.

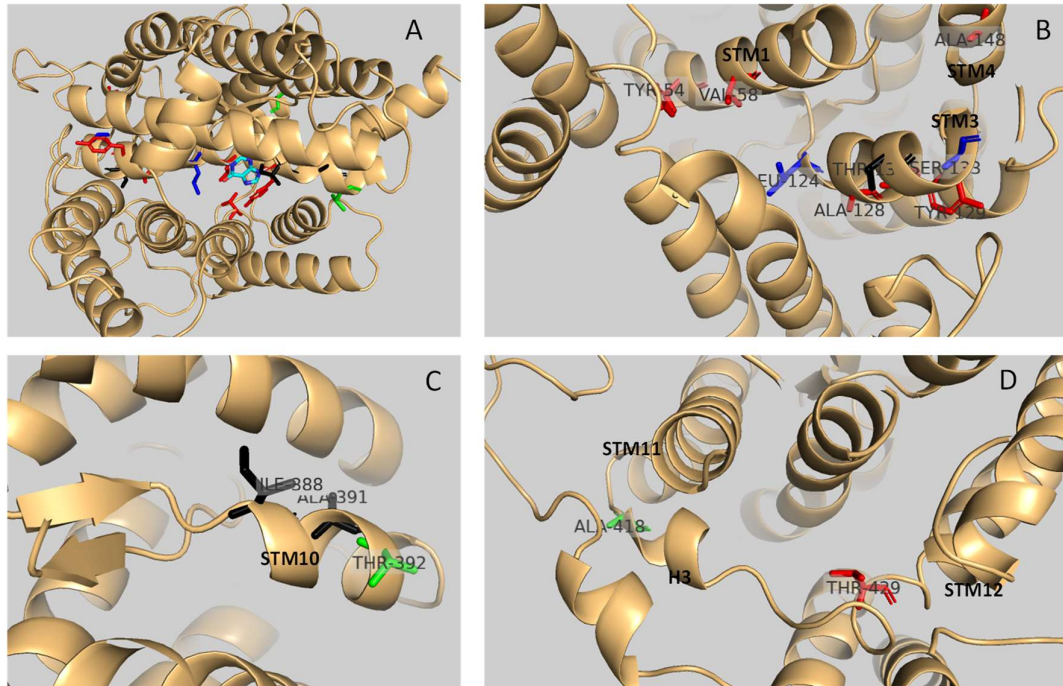


Figura 2-23: Localización de residuos mutagenizados en estructura 3D modelada de PhZ: Los residuos mutagenizados en este trabajo se marcan en colores según el efecto que la mutación sobre el transporte: Rojo pérdida de función del transportador, azul disminución del transporte, verde aumento de transporte y negro no se determinó efecto. A) Vista de lado de la proteína, el sustrato se representa como una molécula de hipoxantina en la configuración especificada en la Figura 2-21A; B) Acercamiento a STM1 con Y54 y V58; STM3 con L124, A128, Y129, T131 y S133; STM4 con A148; C) Acercamiento a STM10 con I388, A391 y T392; D) Acercamiento a STM11-STM12 con A418 en hélice interna y T429 en *loop* antes de STM12.

2.4 Discusión y perspectivas

En este trabajo se presenta un modelo teórico estructural del transportador de purinas PhZ que consiste en 14 segmentos transmembrana, en su mayoría hélices α , que se agrupan espacialmente en dos dominios. Un dominio más compacto que incluye los STM 1-4 y STM 8-11 al que se lo denominó núcleo y otro más flexible que incluye los STM 5-7 y STM12-14 al que se lo denominó entrada. Esta estructura es muy similar a la que está planteada para UapA y AzgA (Alguel et al., 2016; Kryptou et al., 2014). Para definir el sitio de unión al sustrato se analizó la estructura modelada en complejo con el sustrato hipoxantina y 8-azaguanina. De los dos posibles sitios de unión propuestos por el modelo, uno destaca por estar definido por el *cluster* mayoritario para ambos sustratos (conformaciones más representadas) y por tener las conformaciones más favorables desde

punto de vista energético (Figura 2-21 A y Figura 2-22 A). De esta forma se propone que en el sitio principal de unión cuatro residuos interactúan con el sustrato: E389 (STM10), D337 (STM8), R442 (STM12) e I388 (STM10, cuando se trata de hipoxantina) o L124 (STM3, cuando se trata de 8-azaguanina).

Según el modelo generado, las cadenas laterales de los residuos E389, D337, R442 y el grupo amino de I388 (o L124) interactuarían con: N1 (H), N3 (H) y C6=O del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol cuando el sustrato es hipoxantina. Cuando el sustrato es 8-azaguanina la interacción sería con N6 (H) y C3=O del anillo pirimidínico y N4 del imidazol. Además, interacciones de apilamiento tipo π - π con F387 contribuirían a la estabilización del sitio de unión. Estas interacciones no covalentes también sirven para dar sustento al sitio de unión planteado, ya que todos los transportadores similares que han sido modelados tienen uno o dos residuos de fenilalanina formando este tipo de interacción estabilizadora: F335 en AzgA; F144 y F406 en UapA (Alguet et al., 2016; Kryptou et al., 2014). Se postula que las cadenas voluminosas de estos residuos aromáticos aíslan el sustrato en la conformación ocluida y se mueven para liberarlo en la conformación abierta (Shi, 2013).

Al comparar este sitio de unión al sustrato con el propuesto para AzgA se puede observar que tienen otras semejanzas: ambos modelos proponen que un glutamato del STM10 (E389 en PhZ, E394 en AzgA) y un aspartato del STM8 (D337 en PhZ, D339 en AzgA) interactúan con el sustrato. La importancia de estos dos residuos fue verificada mediante análisis mutacional tanto en AzgA como en los transportadores *AzgA-like* de *E. coli* (PurP e YjcD, (Kryptou et al., 2015; Papakostas et al., 2013)). Al igual que lo planteado con E389 de PhZ, la cadena lateral de E394 (análogo de E389) en AzgA también interactuaría con el sustrato en el modelo propuesto para AzgA-hipoxantina. Con las mutaciones de AzgA E394Q y E394A se obtiene pérdida de función del transportador mientras que con la mutación E394D se obtiene un transportador funcional, pero con la afinidades de unión modificadas (Kryptou et al., 2014). Este glutamato es un residuo absolutamente conservado entre las proteínas *AzgA-like*. Respecto al aspartato, si bien según el alineamiento estructural el residuo análogo a D337 en AzgA sería D342, y no D339, en el modelo planteado para esta proteína de *A. nidulans* se propone que el que interactúa con el sustrato sería D339. Los autores también identifican a D342 como un residuo absolutamente crítico para la función de AzgA debido a que la mutación D342E modifica la afinidad de unión por adenina y guanina, (Kryptou et al., 2014). Este es un residuo que se conserva dentro de los transportadores *AzgA-like*,

Análisis de PhZ

entre las proteínas de función verificada, excepto AtAzg2, todas tienen aspartato en esta posición (Figura 2-7).

I388 tiene como residuo análogo en AzgA a V393 cuyo grupo amino también interacciona con la hipoxantina en el modelo propuesto para esta proteína de *A. nidulans*. Al observar los residuos análogos en otras proteínas AzgA-like se puede ver que en esta posición algunos tienen isoleucina al igual que PhZ y otros tienen valina al igual que AzgA. Este fue uno de los residuos analizados en este trabajo y los resultados obtenidos concuerdan con el sitio de unión propuesto ya que el cambio I388V en PhZ no produce variaciones significativas respecto a la proteína silvestre.

Una de las diferencias que tiene el sitio de unión al sustrato que se propone para PhZ y el reportado para AzgA, es respecto a la interacción del sustrato con el grupo amino de la cadena lateral de R442. En el sitio propuesto para la proteína de *A. nidulans* no hay ninguna arginina ni ningún aminoácido básico. R442 se encuentra ubicado en la región carboxilo terminal del STM12. Observando el alineamiento de todas las proteínas AzgA-like se puede ver que si bien es un residuo con cierto grado de variabilidad, está dentro de los motivos propuestos por Papakostas y colaboradores (Papakostas et al., 2013) (Figura 2-1). Arginina y lisina son los residuos que prevalecen, pero también hay otros transportadores que tienen serina, glicina o glutamina en esa posición. Los transportadores de *A. nidulans* y *Aspergillus versicolor* son los únicos que tienen histidina en esta posición. La interacción de R442 con el sustrato es particularmente interesante ya que es la primera vez que un residuo del STM12 se propone como parte del sitio principal de unión en este tipo de transportadores y destaca la importancia de realizar un análisis más detallado de esta zona. Si bien en proteínas NAT se ha identificado la importancia funcional de residuos del STM12, es la primera vez que un residuo de este segmento se propone como parte del sitio de unión al sustrato en este tipo de transportadores. Hasta la fecha todos los modelos proponen que los residuos que forman parte del sitio de unión al sustrato se encuentran en STM1, STM3, STM8 y STM10. Mediante mutaciones en varios residuos del STM12 en UapA (A441, V463, A469) se lograron versiones del transportador con la especificidad de sustratos extendida y se propone que algunos residuos del STM12 estarían implicados en la trayectoria del sustrato (Alguet et al., 2016; Kosti et al., 2010, 2012). Sería interesante evaluar diferentes sustituciones en R442 y combinarlas con sustituciones en D337, E389, I388 y L124.

Otra de las diferencias (con el sitio de unión de AzgA) es respecto a L124, en donde el residuo análogo en la proteína de *A. nidulans* es M128. Al observar los residuos análogos

Análisis de PhZ

en otras proteínas *AzgA-like* se puede ver que al igual que *AzgA* la mayoría tienen metionina en esta posición y el resto tienen leucina al igual que PhZ, excepto algunos transportadores bacterianos (YjcD e YgfQ) que tienen isoleucina. Este fue uno de los residuos mutagenizados en este trabajo. Con la sustitución L124M de PhZ se obtiene un transportador que disminuye la captación inicial de hipoxantina y presenta una afinidad aparente ligeramente aumentada ($K_{m/i}$ disminuye). Si bien esto *a priori* puede parecer una contradicción, en *AzgA* se ha visto que mutaciones que provocan un aumento en la afinidad provocan que el sustrato quede “parcialmente atrapado” afectando la capacidad de transporte (Kryptou et al., 2014). Los ensayos de crecimiento en placa indican que L124M tiene déficit de transporte de 8-azaguanina ya que es más resistente al tóxico que PhZ silvestre. En los ensayos de competencia frente a este sustrato, L124M presenta mayor porcentaje de inhibición que el transportador silvestre lo que indicaría que la 8-azaguanina se une mejor. Estos resultados sugieren que la mutación L124M podría estar afectando la translocación del sustrato y nos permite concluir que L124 es un residuo crítico para la actividad de PhZ. L124 podría interactuar directamente con el sustrato o estar muy próximo (a distancia de enlace) de los residuos que interactúan con el mismo. Además, los resultados concuerdan con el modelo de interacción planteado para PhZ-8-azaguanina (Figura 2-6). En el modelo propuesto para *AzgA* se propone que G129, residuo contiguo a M128, forma enlaces de hidrógeno con el sustrato sólo cuando éste es guanina (grupo amino) y no cuando el sustrato es hipoxantina o adenina (si bien la mutación G129A afecta la afinidad de unión por guanina, hipoxantina y adenina). En *AzgA* la mutación G129F provoca pérdida de función del transportador, aunque los niveles de proteína y su localización son normales.

En suma, tanto los resultados experimentales como el modelo estructural indican que la proteína PhZ y su homóloga de *A. nidulans* (*AzgA*) son muy similares, tienen la misma estructura, transportan los mismos sustratos y tienen diferencias en los sitios principales de unión. Un resultado que respalda esta diferencia en la unión al sustrato es que, si bien ninguno es capaz de transportar xantina, PhZ podría interactuar con la xantina en su sitio de unión principal lo que explicaría porque en los ensayos de competencia esta purina es capaz de inhibir significativamente el transporte de hipoxantina marcada.

Durante este trabajo se obtuvieron dos modelos por homología de PhZ que plantean la misma estructura general. Ambos fueron construidos de manera similar, utilizando la misma proteína como molde y, dado el bajo porcentaje de homología con el *template*, los

Análisis de PhZ

dos fueron realizados en base a un alineamiento curado manualmente usando la información disponible en las bases de datos. Para definir el sitio de unión aquí presentado se utilizaron los resultados de los *docking* obtenidos con el segundo modelo (refinado mediante dinámica molecular), los obtenidos con el primer modelo (utilizado para la selección de residuos a mutar) proponen que el sustrato interactuaría con otros residuos (Figura 2-5 y Figura 2-6). A la hora de definir el sitio de unión al sustrato las diferencias entre ambos modelos toman importancia porque el corrimiento en unos pocos Å puede determinar que un residuo se encuentre o no a la distancia necesaria para que la formación del enlace de hidrógeno sea o no sea favorable. Esto aclara la importancia de acompañar el modelado por homología con refinado mediante dinámica molecular cuando la identidad entre la proteína objetivo y el molde es baja, como es el caso de PhZ con UapA. Cabe destacar que este tipo de abordaje es válido y aporta información muy valiosa para ser contrastada con datos experimentales, sobre todo cuando se trata de proteínas que por ubicarse en la membrana y por su tamaño dificultan otras aproximaciones como la obtención de cristales y el modelado *ab initio*.

Expresar los transportadores de *P. chrysosporium* en *A. nidulans* permitió trabajar en un contexto conocido. *A. nidulans*, además de tener características que favorecen la expresión de proteínas heterólogas y que permiten el desarrollo de numerosas herramientas moleculares para el estudio de transportadores, es el organismo donde se ha estudiado en mayor detalle tanto el catabolismo como el sistema de captación de purinas. Todas las versiones de PhZ (silvestre y mutantes) se expresaron en un mismo contexto genético, y por tanto metabólico, por lo que las diferencias de transporte pueden atribuirse a los residuos sustituidos.

Análisis de PhZ

Tabla 1: Resumen del análisis funcional de mutantes PhZ. STM indica la ubicación de cada mutación en la estructura tridimensional planteada por el modelo. V(%) es el porcentaje de captación inicial de hipoxantina. % Proteína indica la estimación cualitativa de la intensidad relativa de PhZ-GFP/actina que se muestra en el *western blot* de la Figura 2-14. En los datos * indica que en el mutante S133T se observa mayor cantidad de proteína asociada a vacuolas; nd: no determinado; nc: no corresponde ;(E): diferencias de estabilidad; no (< />): diferencias de expresión proteica. Las mutaciones se muestran agrupadas en 4 grupos según el fenotipo de transporte que provocan: rojo: pérdida de transporte; azul: disminución del transporte; negro: transporte equivalente a PhZ silvestre y verde: aumento del transporte.

Mutación	STM	Crecimiento en hipoxantina	Crecimiento en 8-azaguanina	V(%)	Localización subcelular equivalente a PhZwt	% Proteína equivalente a PhZwt
Y54G	1	–	+++	4	no	nd
V58A	1	–	+++	3	si	si
A128F	3	–	+++	2	no	nd
Y129D	3	–	+++	2	no	nd
A148V	4	–	+++	3	no	nd
T429P	11-12	–	+++	3	no	nd
L124M	3	–	++	27	si	si
S133T	3	–	++	52	si*	no (E)
T131A	3	+	+	97	si	no (<)
I388V	10	+	+	87	si	no (E)
A391G	10	+	+	79	si	si
T392A	10	++	–	131	si	no (>)
A418V	11-12	++	–	130	si	si
Controles						
PhZwt		+	+	100	nc	nc
AzgA wt		++	–	152	nc	nc
ΔZAC		–	+++	8,5	nc	nc

En este trabajo se analizaron trece mutaciones, tres de las cuales (T131A, I388V y A391G) presentaron un comportamiento equivalente a la versión silvestre del transportador (Tabla 1). Estas mutaciones no afectan el tráfico hacia la membrana plasmática ni la actividad de transporte (crecimiento en placa y captación de ³H-hipoxantina) por lo que las diferencias en el nivel proteico observadas en T131A e I388V no alcanzan a afectar el transporte. Los resultados del *western blot* mostraron que, respecto a PhZ silvestre, el mutante I388V presenta un aumento de estabilidad y el mutante T131A presenta un menor nivel de expresión proteica. Si bien estas diferencias no afectan el funcionamiento del transportador en ninguno de los parámetros evaluados, sería interesante determinar la constante de afinidad ya que el menor nivel proteico podría estar siendo contrarrestado con una mayor afinidad por el sustrato. En AzgA se han analizado mutaciones (T49A) que provocan aumento de afinidad por hipoxantina con menores niveles de expresión proteica (Kryptou et al., 2014). Los tres residuos se encuentran en la periferia del sitio de unión principal pero, como se describió

Análisis de PhZ

previamente, I388 es el único que interaccionaría con el sustrato según el modelo propuesto. En las demás proteínas conocidas de la familia *Azga-like* las variantes en la posición de T131 son treonina como PhZ o alanina. Lo mismo ocurre con la posición I388 donde la otra variante es valina, el residuo por el que fue sustituido en el mutante analizado. En la posición correspondiente a A391 esto mismo se cumple si se consideran sólo los transportadores fúngicos (las variantes en esta posición son alanina o glicina) ya que en el caso de los procariontes es un residuo altamente variable. Sería interesante analizar otras sustituciones en estas posiciones.

Con diez de los mutantes analizados se obtuvieron diferencias de transporte respecto a PhZ silvestre, ya sea porque provocaron pérdida total de la capacidad de transporte (Y54G, V58A, A128F, Y129D, A148V y T429P), disminución (L124M y S133T) o aumento del mismo (T392A y A418V).

La estructura tridimensional propuesta por el modelo permitiría explicar el resultado de nueve de estas diez mutaciones ya que se encuentran en regiones a las que ya les ha sido asignada importancia funcional: T429P y A418V se encuentran entre el STM11 y STM12 y el resto son sustituciones en residuos que se encuentran ubicados en STM1, STM3 y STM10, la mayoría formando parte del motivo β antiparalelo. El análisis de mutantes y modelos de otros transportadores relacionados con PhZ plantea que los residuos de estos STM cumplen funciones relacionadas con la trayectoria del sustrato, la especificidad del transportador o la formación de interacciones polares críticas (Alguel et al., 2016; Kosti et al., 2012; Kryptou et al., 2014; Papakostas et al., 2013). Cinco de las seis mutaciones de pérdida total del transporte se encuentran en estos STM: Y54G y V58A en STM1, A128F e Y129D en STM 3 y T429P en el *loop* SMT11-12, mientras que la mutación A148V del STM4 se ubica en una región para la que no hay reportes que asignen un rol relacionado al transporte. Las respectivas cepas son incapaces de crecer utilizando hipoxantina como fuente de nitrógeno, son resistentes al tóxico 8-azaguanina y tienen una tasa de captación de hipoxantina equivalente a la cepa Δ ZAC. Los mutantes Y54G, A128F, Y129D, A148V y T429P, no alcanza la membrana plasmática, probablemente debido a problemas en el plegamiento. Estos resultados nos permiten concluir que Y54 (STM1), A128 (STM3), Y129 (STM3) y A148 (STM4) son importantes para el mantenimiento de la arquitectura del transportador. En el caso de T429 la sustitución por prolina genera un cambio a nivel estructural. La prolina se considera un terminador de las hélices ya que su C_{α} no tiene libertad de giro y al estar integrado en un anillo interfiere en

la formación de puentes de hidrógeno. Por esto la sustitución por prolina explicaría los resultados obtenidos, independientemente del rol de T429. Todos estos residuos tienen alto grado de conservación entre las proteínas *AzgA-like*. En el caso de V58A, la proteína alcanza la membrana, no se observa modificaciones en el tráfico o aumento en la tasa de recambio proteico por lo que las diferencias observadas en la captación de hipoxantina y en los ensayos de crecimiento en placa reflejan una verdadera disminución en la actividad de transporte y se puede concluir que V58 del STM1 es clave para la funcionalidad de PhZ (ver más adelante). Este residuo se ubica dentro de uno de los motivos *AzgA-like* definidos previamente (motivo 1, Barraco-Vega, 2014) y es uno de los residuos absolutamente conservados. Según nuestro modelo se encontraría en la periferia del sitio de unión principal, a menos de 10 Å del sustrato. La importancia funcional de los residuos del STM1 ya se ha probado mediante el análisis de otros residuos invariantes del motivo 1 (Kryptou et al., 2014; Papakostas et al., 2013).

La mutación T49A en *AzgA* provoca una disminución de la captación de hipoxantina y aumento de afinidad por la misma con menores niveles de expresión proteica (Kryptou et al., 2014). La misma sustitución en el transportador *YgfD* de *E. coli* (T35A) provoca disminución de la afinidad de sustrato (Papakostas et al., 2013), mientras que en el otro transportador *AzgA-like* de *E. coli* esta sustitución (PurP: T38A) no modifica la afinidad ni captación del sustrato natural de este transportador (adenina) (Papakostas et al., 2013). En transportadores tipo NAT la histidina invariante del STM1 que es análoga estructuralmente a esta treonina fue asignada como importante para la unión de alta afinidad del sustrato en *XanQ* (*E. coli*), estrictamente insustituible para el transporte en *UacT* (*E. coli*) e importante para el correcto plegado y localización en membrana en *UapA* (Amillis et al., 2011; Karena & Frillingos, 2009; Kryptou et al., 2014; Papakostas et al., 2013; Papakostas & Frillingos, 2012). Esta histidina es el único residuo invariante que presentan los transportadores tipo NAT en el STM1 mientras que las proteínas *AzgA-like* presentan 5 residuos invariantes en este STM: E41, T48, M52, Y54 y V58 (numeración PhZ). T48 es la treonina que fue analizada mediante mutaciones en *AzgA* (T49A y T49S), *YgfD* (T35A) y *PurP* (T38A). En este trabajo se analizaron los mutantes Y54G y V58A. Los resultados obtenidos indican que V58 es indispensable para el correcto funcionamiento de PhZ, como se mencionó previamente, e Y54 es importante para el mantenimiento de la estructura del transportador. Se seleccionó la sustitución de tirosina a glicina en la posición 54 (Y54G) trasladando las coordenadas de la molécula de xantina cristalizada junto a *UapA* al modelo de PhZ. Con este abordaje se planteaba la

hipótesis de que Y54 podía formar parte del sitio de unión y el carbonilo de esta tirosina podría reemplazar el oxígeno de la xantina y reducir la afinidad de PhZ por esta purina. Los resultados del *docking* molecular muestran que Y54 no formaría parte del sitio de unión al sustrato principal y su sustitución a glicina provoca pérdida de transporte que se asociaría a dificultades en el plegamiento. Respecto a V58, ya que en UapA a aquellos residuos del STM1 que interaccionan con residuos del STM3 y STM10 se les ha atribuido la función de mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión, se podría pensar que el efecto de pérdida de función provocado por V58A sea atribuible a una función semejante (Alguel et al., 2016). En este sentido, V58 (STM1) se encuentra en la periferia del sitio de unión e interaccionaría con residuos del motivo β antiparalelo, sin embargo no estaría incluido entre los residuos que interaccionan con los STM3 y STM10 (según los resultados obtenidos con el *docking* molecular). Por lo que, más que en el mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión, podría tener un rol en el proceso de translocación del sustrato.

Las dos mutaciones (L124M y S133T) que producen una disminución del transporte se encuentran en el STM3, siendo L124 el primer residuo de este STM y S133 el último. En el mutante L124M se observa una disminución de la captación inicial de hipoxantina acompañada de un leve aumento de la afinidad aparente por este sustrato, la proteína alcanza la membrana plasmática y no se observan diferencias respecto al recambio ni nivel proteico. Estos resultados, como se describió previamente, concuerdan con el modelo planteado, ya que L124 sería uno de los residuos que interaccionarían con el sustrato. Con la sustitución S133T se obtiene un transportador que disminuye la captación inicial de hipoxantina sin modificar la afinidad de unión por esta purina. Indicando que esta mutación no afecta el plegado ni la capacidad de unión del sustrato. Los resultados del *western blot* muestran que la banda correspondiente a GFP libre de S133T es más intensa que la del transportador silvestre lo que indicaría que en el mutante hay mayor nivel de degradación proteica. Los resultados de localización subcelular indican que S133T tiene un comportamiento similar al silvestre, diferenciándose en que hay menor cantidad de proteína asociada a la membrana y mayor cantidad en vacuolas. Estas diferencias en la estabilidad y recambio proteico podrían explicar la disminución en la tasa de captación de hipoxantina. Esta modificación en la estabilidad provocada por el cambio de serina por treonina en esta posición no fue un resultado esperado. S133 se encuentra dentro de uno de los motivos *AzgA-like* definidos (motivo 2) y al observar el

alineamiento se puede ver que la treonina es un residuo presente en esta posición en transportadores de esta familia en todos los grupos (bacterias, plantas, hongos Basidiomycotas y hongos Ascomycotas) por lo que si bien a priori es difícil explicar el resultado, tal vez el cambio genere alguna diferencia a nivel estructural.

Finalmente, las mutaciones T392A y A418V, generan un aumento de la captación inicial de hipoxantina sin modificar la afinidad de unión por esta purina. Según el modelo planteado ninguno de estos residuos formaría parte del sitio de unión principal. Esto explica porque las mutaciones no afectarían la afinidad de unión, pero el modelo no permite explicar el aumento en la tasa de captación. Respecto al transporte de 8-azaguanina cabe señalar que en los ensayos de crecimiento en placa las cepas con estas mutaciones son más sensibles, y en los ensayos de competencia presentan mayor porcentaje de inhibición, que el transportador silvestre. Estos resultados sugieren que T392A y A418V podrían tener mayor afinidad de unión por 8-azaguanina que por hipoxantina. Para verificar esta hipótesis sería necesario determinar la constante de afinidad por el sustrato tóxico. Los resultados del *western blot* muestran que en el caso de T392 el fenotipo de aumento de transporte obtenido podría explicarse por un aumento en la cantidad de proteína, pero en el caso de A418 no se observa ninguna diferencia con respecto al transportador silvestre. T392 se encuentra en el STM10, en la periferia del sitio de unión principal, y si bien no forma parte del sitio se encuentra a menos de 10 Å del sustrato. En UapA a residuos del STM10 (G411, T416, R417) que no forman parte del sitio de unión al sustrato pero se encuentran en su periferia, se les ha asignado un rol relacionado a la trayectoria del sustrato (Kosti et al., 2012). A418 es el primer residuo de la hélice interna que se encuentra entre el STM11 y STM12. Al residuo A441 de UapA, que se encuentra en esta hélice interna alejado del sitio de unión al sustrato (al igual que A418 de PhZ), se le ha atribuido un rol relacionado a la selectividad de sustrato ya que mutaciones en este residuo (A441V) dan como resultado un transportador con diferencias de especificidad debida a un aumento en la capacidad de transporte sin modificación de la afinidad de unión (Kosti et al., 2010, 2012). La evidencia experimental aquí obtenida indica que A418 de PhZ tiene un rol clave en el transporte. Cabe destacar que este es el primer trabajo que identifica en un transportador *AzgA-like* residuos críticos para el transporte en la hélice interna entre los STM11-STM12. Dado que el modelo estructural no permite explicar el rol que tienen en el transporte del sustrato T392 y A418, para determinar si estos residuos podrían estar implicados en la trayectoria del sustrato, en la

vía de translocación o actuar como filtros de selectividad sería interesante poder realizar simulaciones de dinámica molecular. Otro posible abordaje sería realizar un modelo estructural de PhZ en la conformación abierta, por homología con algún transportador cristalizado en esta conformación. Esto podría servir para determinar si estos residuos tienen algún rol en los cambios conformacionales que acompañan el proceso de translocación del sustrato.

De acuerdo con la idea de que las proteínas *AzgA-like* forman un grupo funcional y evolutivamente distinto al de los transportadores NAT, todos los residuos determinados como funcionalmente críticos para PhZ mediante el análisis mutacional al igual que los determinados para *AzgA* (Kryptou et al., 2014) tienen alto grado de conservación en la familia *AzgA-like* pero ninguno se conserva en la familia NAT.

2.5 Conclusiones

Este trabajo propone que el transportador *AzgA-like* de *P.chryso sporium* tiene una estructura tridimensional compuesta por 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas, y un motivo β antiparalelo formado por una hoja β próxima al STM3 y otra próxima al STM10. Se distinguen dos dominios: uno más compacto que incluye los STM 1-4 y STM 8-11; y otro más flexible que incluye los STM 5-7 y STM12-14. Entre estos dominios se encuentra la cavidad donde se uniría el sustrato. El sitio principal de unión al sustrato de PhZ estaría formado por: D337 (STM8), E389 (STM10), R442 (STM12) e I388 (STM10, cuando se trata de hipoxantina) o L124 (STM3, cuando se trata de 8-azaguanina). Las cadenas laterales de los residuos E389, D337, R442 y el grupo amino de I388 (o L124) interaccionarían con: N1 (H), N3 (H) y C6=O del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol cuando el sustrato es hipoxantina. Cuando el sustrato es 8-azaguanina la interacción sería con N6 (H) y C3=O del anillo pirimidínico y N4 del imidazol.

El modelo presentado indica que PhZ y su homólogo de *A. nidulans* (*AzgA*) tendrían la misma estructura tridimensional con diferentes sitios de unión al sustrato. La interacción de R442 con el sustrato es particularmente interesante ya que es la primera vez que un residuo del STM12 se propone como parte del sitio principal de unión en este tipo de transportadores.

Mediante el análisis experimental se determinó que otros residuos que no forman parte del sitio principal de unión al sustrato predicho por el modelo son claves para la actividad

Análisis de PhZ

de transporte: V58 (STM1), S133 (STM3), T392 (STM10) y A418 (hélice interna STM11-STM12) ya que sustituciones en estos residuos provocan disminución o aumento de la captación de hipoxantina sin modificar la afinidad de unión por esta purina (V58A, S133T, T392A y A418V). Los resultados también indican que Y54 (STM1), A128 (STM3), Y129 (STM3) y A148 (STM4) son importantes para el mantenimiento de la arquitectura del transportador ya que con sustituciones en estos residuos se obtienen versiones de PhZ que no alcanzan la membrana. En particular este es el primer trabajo que identifica en un transportador *AzGA-like* residuos críticos para el transporte en la hélice interna entre STM11-STM12.

Como era de esperar el conjunto de resultados experimentales y modelados teóricos, reflejan que si bien PhZ y su homólogo de *A. nidulans* (*AzGA*) son muy similares en lo referente a su estructura global y a los sustratos que transportan, presentan diferencias en los sitios de unión al sustrato y en los procesos de transporte en los cuales intervienen varios residuos que no forman parte del sitio principal de unión y algunos están topológicamente alejados del mismo.

Los resultados obtenidos en este capítulo, utilizando como modelo el transportador de purinas *AzGA-like* del Basidiomycota *P. chrysosporium* es un aporte a la consolidación del modelo estructural de proteínas de esta familia y contribuye mediante evidencia experimental al conocimiento de su relación estructura-función.

3 Análisis de PhU

Transportador de purinas tipo NAT de
Phanerochaete chrysosporium

3.1 Introducción

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

La estructura cristalográfica de UapA logro obtenerse a partir de un mutante, que logra unir xantina aunque su transporte es inactivo. La estructura del complejo transportador-xantina fue resuelta mediante *scattering*. UapA contiene 14 STM, organizados en un núcleo formado por STM1-4 y STM 8-11 y un dominio de entrada formado por los STM 5-7 y 12-14 (Figura 3-1). El *loop* extracelular entre los STM 3 y 4 contiene un puente disulfuro entre las C174 y C185; estos residuos se encuentran altamente conservados en hongos y son indispensables para el correcto plegamiento y localización subcelular de la proteína. También se probó que el STM 13 está estrechamente asociado a la formación del dímero, insertándose en un hueco formado en el monómero opuesto (Alguel et al., 2016).

El sitio de unión del sustrato se encuentra en un motivo β antiparalelo formado entre los STM 3 y 10. La unión a la xantina se da mediante enlaces de hidrógeno con los residuos Q408 (STM10), E356 (STM8), A407 (STM10), V153 (STM3) y F155 (STM3), todos pertenecientes al núcleo de la proteína. Los residuos identificados como responsables de la especificidad de unión al sustrato son: F406, (sitio de unión), V463 y A469 (STM12), y T526 y F528 (STM14). Estos últimos cuatro se encuentran ubicados en la interfase entre el dominio de entrada y el núcleo de la proteína cerca del sitio de unión. El residuo R481 es indispensable para la formación del dímero (Alguel et al., 2016).

Muchos de los residuos implicados en el sitio de unión fueron identificados previamente por análisis mutacionales. Entre estos residuos, se proponía que E356 formaba contactos directos con el anillo purínico, en base al hecho de que una mutación específica (E356D) aumentaba dramáticamente la unión a los sustratos fisiológicos pero reducía su transporte (Papageorgiou et al., 2008). El rol del aminoácido parcialmente conservado, Q408, ya

había sido propuesto como involucrado en el contacto directo con los sustratos, porque su sustitución por prolina reducía dramáticamente la unión a los sustratos fisiológicos, pero principalmente porque su sustitución por glutamato le confería la capacidad de reconocer otros sustratos como hipoxantina y guanina (Koukaki et al., 2005). Otros cuatro residuos absoluta o parcialmente conservados (H86, G411, T416 y R417) han sido también identificados como determinantes de la actividad de transporte de UapA (Goudela et al., 2005; Koukaki et al., 2005; Pantazopoulou & Diallynas, 2006). Es importante destacar que muchos de estos residuos que son esenciales para la función de UapA son también críticos para la actividad de transportadores homólogos (Frillingos, 2012). También se determinó que mutaciones en nueve residuos que no se conservan o están parcialmente conservados (N71, Q113, F406, A441, V463, A469, R481, T526 y F528) distribuidos en varias regiones de UapA, aumentan el perfil de sustratos del transportador. Sin embargo, ninguno de estos residuos es crítico para la unión o eficiencia del transporte (Amillis et al., 2001; Kosti et al., 2010; Papageorgiou et al., 2008; Vlanti et al., 2006).

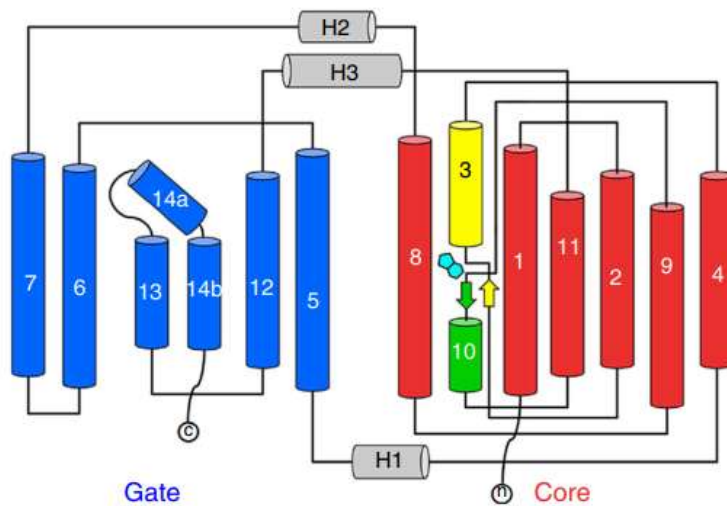


Figura 3-1: Diagrama topológico de UapA. Las hélices α son representadas como cilindros y las hojas β como flechas. El sitio de unión al sustrato se encuentra entre la parte N terminal de los segmentos 3 y 10. La proteína se encuentra dispuesta en dos dominios, el dominio de entrada representado en azul y el núcleo representado en rojo. Extraído de (Alguel et al., 2016).

Mediante simulaciones de dinámica molecular derivadas del análisis de la estructura se sugiere una vía de translocación del sustrato desde el sitio de unión al interior de la célula que, si bien debe tratarse con precaución dada la resolución del cristal, tiene consistencia con datos experimentales. Inicialmente, la xantina permanece fuertemente ligada a Q408 mientras gira dentro de la cavidad que forma el sitio de unión. Interactúa con L459, V463

y S466 cerca del sitio de unión mientras que R481 del monómero opuesto se acerca a la cavidad central de unión. Esto efectivamente crea una barrera de especificidad en el camino hacia el citoplasma con la xantina formando un enlace de hidrógeno transitorio e interacciones tipo apilamiento π - π con R481, antes de pasar finalmente al citosol con cambios conformacionales de la cadena lateral de R481 y la interacción R481-Q408. Durante este proceso se propone además que hay un desplazamiento gradual del STM 10, que puede ser necesario para la salida del ligando (Alguel et al., 2016).

PhU (593 aa) presenta alta similaridad e identidad con UapA (79% y 50%, respectivamente, con una cobertura del 93%) y con el resto de las proteínas NAT de función conocida. Presenta los residuos altamente conservados en las proteínas de esta familia destacándose: los 13 residuos invariantes y el motivo característico “*NAT signature motif*”: Q⁴²⁵-N⁴²⁶-N⁴²⁷-G⁴²⁸-X4-T⁴³³-R⁴³⁴, que es idéntico al de UapA.

PhU transporta los mismos sustratos que UapA y presentan la misma regulación postraduccional (responden al mecanismo de endocitosis en respuesta a una fuente primaria de nitrógeno) pero presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos ya que cuando son expresados en el mismo contexto genético (y por tanto metabólico) se obtienen diferentes eficiencias de transporte (*i.e.* diferente crecimiento con los mismos sustratos). Por ejemplo, las cepas que expresan UapA transportan xantina y ácido rico al mismo nivel, mientras que las que expresan PhU transportan xantina con mayor eficiencia que ácido úrico. Además las cepas de *A. nidulans* que expresan PhU tienen cierta capacidad de crecer en hipoxantina que no se observa cuando la misma cepa expresa UapA (Barraco-Vega, 2014; Barraco-Vega et al., 2017). En base a estos resultados se plantea la hipótesis de que analizando las diferencias en residuos claves se podrían explicar las diferencias de transporte.

3.2 Objetivos del capítulo

3.2.1 Objetivo general

Aportar al modelo existente de proteínas de la familia NAT, utilizando como modelo el transportador PhU de *Phanerochaete chrysosporium*.

3.2.2 Objetivos específicos:

- i. Modelado de la proteína PhU.
- ii. Identificación de residuos críticos para PhU
- iii. Análisis del rol de residuos seleccionados por mutagénesis dirigida.

La estrategia planteada para cumplir estos objetivos fue la generación de modelos estructurales *in silico* de PhU por homología con proteínas cristalizadas y el análisis de los mismos poniendo especial atención en 8 residuos (A120, V157, T159, S421, I422, S458, R486 y P546) que fueron seleccionados por presentar diferencias con los residuos reportados como críticos en UapA (Q113, M151, V153, T404, T405, A441, A469, G527). Además, se propuso la construcción de mutantes puntuales en tres de estos residuos (A120, S458 y P546), por ser los residuos que se ubican en la misma posición que aquellos en los que en UapA se le ha asignado un rol relacionado a la especificidad. Nos planteamos construir versiones de PhU que en estos residuos fueran sustituidos por el aminoácido correspondiente de UapA (A120Q, S458A y P546G). Para generar estos mutantes se utilizó el mismo sistema de trabajo que el descrito en el capítulo anterior: transformación de una cepa receptora carente de transportadores principales de purinas (Δ ZAC) con *cassettes* que dirigen la integración al locus del gen *azgA*. La estrategia utilizada para la construcción de los *cassettes* que contienen los genes mutantes fue diferente, en este caso las mutaciones se generaron *in vitro* sobre ADN_g de una cepa de *A. nidulans* portadora del *cassette* con *phU* silvestre fusionado a un gen que codifica para la proteína verde fluorescente. El efecto de las mutaciones generadas se evaluó por crecimiento en presencia de purinas y análogos, ensayos de transporte (*uptakes*) y seguimiento *in vivo* de localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia.

3.3 Resultados

3.3.1 Identificación de residuos críticos para PhU

A partir de alineamientos de secuencia de la proteína PhU con UapA y el resto de las proteínas NAT de función verificada, se observó que de los 29 residuos identificados como críticos para la función de UapA (Alguel et al., 2016; Kosti et al., 2012), PhU difiere solo en ocho (Figura 3-2):

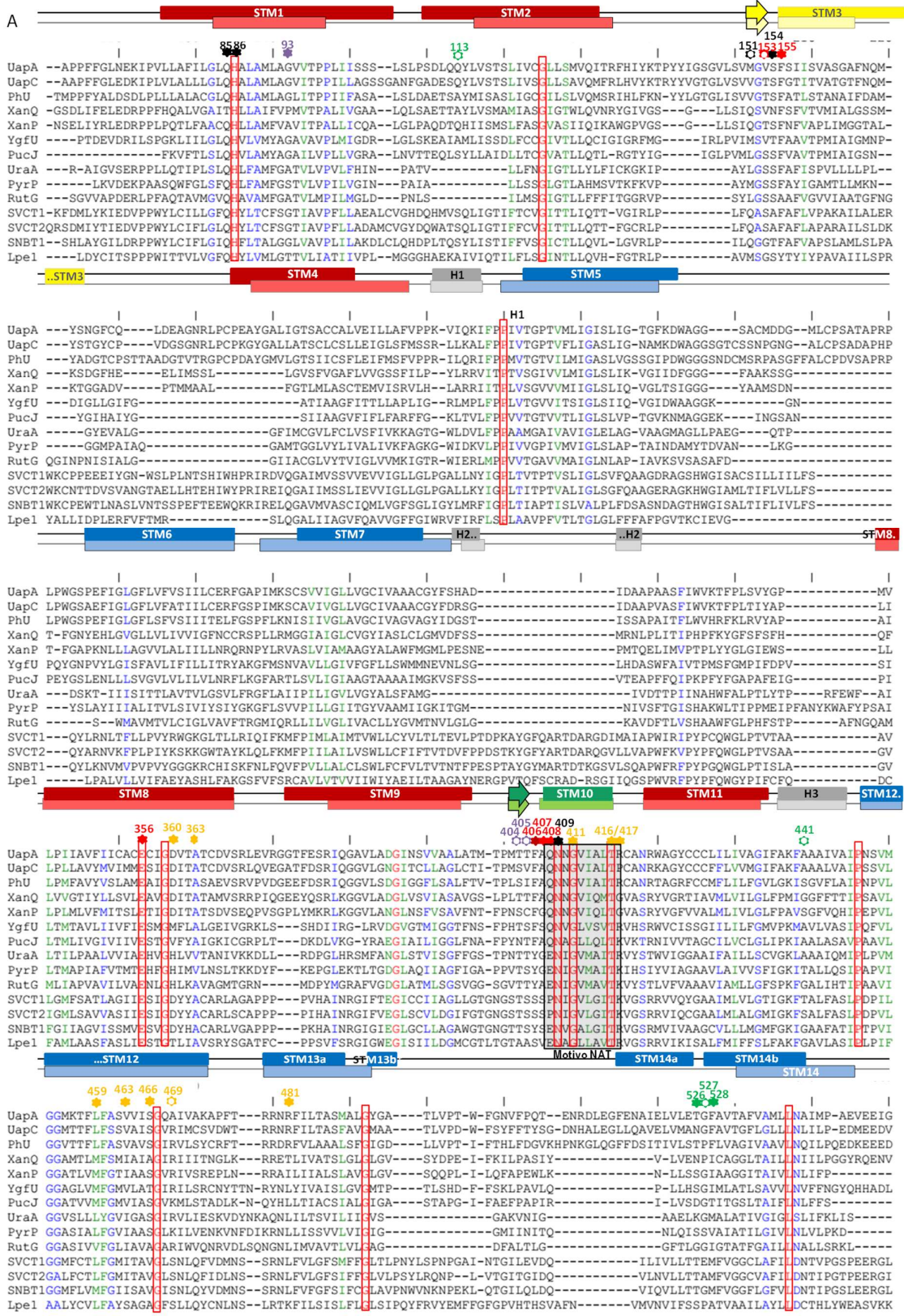
Análisis de PhU

- Q113, A441 y G527 (A120, S458 y P546 en PhU, respectivamente), identificados como críticos para la especificidad de UapA,
- M151 (V157 en PhU) al que se le ha asignado un rol de interacción con los segmentos transmembrana,
- V153 (T159 en PhU), el cual es uno de los residuos que interacciona con el sustrato según el modelo que se ha propuesto para UapA.
- A469 (R486 en PhU), residuo implicado en la vía de translocación del sustrato en el modelo propuesto para UapA.
- T404 y T405 (S421 y I422 en PhU), dos residuos que forman parte del motivo β y que según el modelo propuesto contribuyen con la arquitectura del sitio de unión de UapA.

Los aminoácidos presentes en estas posiciones en la secuencia de PhU están también presentes en otros transportadores NAT de función verificada: XanQ, YgfU y Lpe1 también tienen alanina en la posición de Q113^{UapA}; YgfU, PyrP y Lpe1 tienen valina en la posición de M151^{UapA}; UapC y XanP tienen treonina en la posición de V153^{UapA}; UapC y XanP tienen serina en la posición de T404^{UapA}; XanP y SVCT2 tienen serina en la posición de A441^{UapA}; XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG tienen arginina en la posición de A469^{UapA}; XanQ y Lpe1 tienen prolina en la posición de G527^{UapA}. La única excepción se encuentra al comparar la treonina 405 de UapA, donde PhU es el único entre los transportadores de función verificada que presenta una isoleucina en esta posición (I422^{PhU}), este residuo está en una región que presenta mayor variabilidad, la mayoría tiene treonina o serina en esta posición, pero UapC tiene valina, XanP tiene cisteína y Lpe1 tiene alanina (Figura 3-2).

Con estas observaciones planteamos la hipótesis de que analizando los cambios en estos residuos se podría llegar a explicar las diferencias observadas entre PhU y UapA (Barraco-Vega et al., 2017). Nos propusimos realizar el modelado tridimensional de PhU para evaluar si los cambios en estos residuos pueden explicar las hipótesis planteadas, y construir mutantes en los tres residuos a los que se le ha asignado un rol relacionado a la especificidad sustituyendo el residuo de PhU por el correspondiente en UapA (generando las mutaciones A120Q, S458A y P546G).

Análisis de PhU



Análisis de PhU

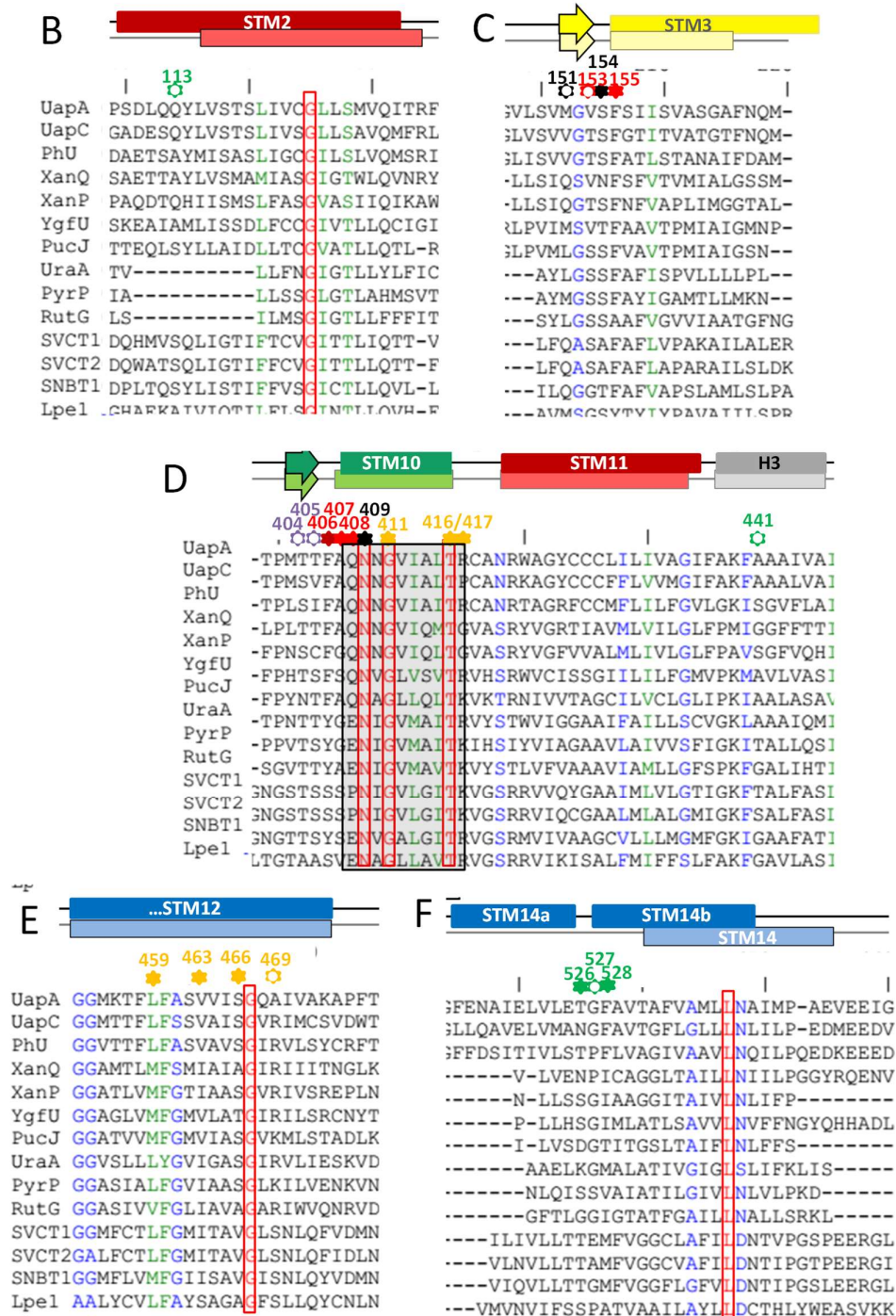


Figura 3-2: Análisis de PhU, y homólogos NAT de función conocida. A) Alineamiento mediante ClustalW de PhU; UapA y UapC de *A. nidulans* (GI: 88984992, 790973); Lpe1 de *Zea mays* (GI: 162462794); SNBT1 de *Rattus norvegicus* (GI: 284010030); SVCT1 y SVCT2 de *Homo sapiens* (GI: 6652824, 6048257); XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG de *E. coli* (GI: 161784262, 84028014, 85675700, 18775829, 89107857, respectivamente); PucJ de *Bacillus subtilis* (GI: 16080296) y PyrP de *Lactococcus lactis* (GI: 15673585). Se omitieron las regiones 1-100 y 661-740 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Sobre el alineamiento se esquematiza la estructura secundaria propuesta por los modelos PhU realizados en este trabajo: PhU^{UapA} en oscuro y PhU^{UraA} en colores claros. Los segmentos transmembrana

(STM) se representan mediante rectángulos rojos y azules, los que forman hojas β mediante flechas y las hélices intracelulares mediante rectángulo grises. La proteína se encuentra dispuesta en dos dominios, el dominio de entrada representado en azul y el núcleo representado en rojo. En amarillo y verde se marcan los segmentos que forman el motivo β antiparalelo. Los residuos invariantes se muestran recuadrados en rojo. El motivo NAT (Q/E/P)-N-X-G-X4-T-(R/K/G) se muestra recuadrado en negro y sombreado en gris. Los aminoácidos críticos para la función y especificidad de UapA se marcan con estrellas de color y los que son diferentes en PhU con estrellas de color y centro blanco: rojo los que interactúan con el sustrato; violeta los que contribuyen con la arquitectura del sitio de unión; naranja los implicados en la vía de translocación, verde los que amplían la especificidad y negros los implicados en la interacción de los segmentos transmembrana según (Alguel et al., 2016; Kosti et al., 2012). La numeración de los aminoácidos marcados se corresponde con la secuencia de UapA. B-F) Se muestra en detalle la porción del alineamiento de la parte A donde está ubicado el residuo: Q113 de UapA que se corresponde con A120 de PhU (B), M151 y V153 de UapA que se corresponden con V157 y T159 de PhU (C); T404, T405 y A441 de UapA que se corresponde con S421, I422 y S458 de PhU (D); A469 de UapA que se corresponde con R486 de PhU (E) y G527 de UapA que se corresponde con P546 de PhU.

3.3.2 Modelado del transportador PhU

Al inicio de este trabajo se modeló la estructura tridimensional de PhU por homología en base a la estructura cristalográfica de UraA de *E. coli* (modelo PhU^{UraA}). Pero dado que el porcentaje de identidad entre PhU y UraA es bajo (26% identidad, 50% similitud, 69% cobertura) era esperable que el modelo obtenido no fuera completamente correcto, por esta razón cuando la proteína UapA de *A. nidulans* fue cristalizada (Alguel et al 2016) se realizó un nuevo modelo de PhU (modelo PhU^{UapA}) utilizando como molde esta proteína fúngica que presenta mayor similitud e identidad con PhU (79% similitud, 50% identidad) y se compararon los resultados obtenidos con ambas aproximaciones. Los modelos obtenidos en ambos casos proponen una estructura tridimensional de PhU que consiste en 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas, y un motivo β antiparalelo formado por una hoja beta próxima al STM3 y otra próxima al STM10 (Figura 3-2). Mediante ambos modelos se puede observar que la proteína queda dividida en dos dominios (entrada y núcleo) (Figura 3-3). Al comparar ambos modelos se observa que presentan muy pocas diferencias: i) en PhU^{UraA} los STM 1, STM 2, STM3, STM5 y STM9 son más cortos que en PhU^{UapA} mientras que el STM 7 tiene mayor longitud; ii) STM13 y STM14 en modelo PhU^{UapA} se encuentran divididos en dos segmentos mientras que en el modelo PhU^{UraA} se presentan como hélice transmembrana enteras de 13 (R₄₉₅-G₅₀₈) y 15 residuos (P₅₄₆-L₅₆₁), respectivamente.

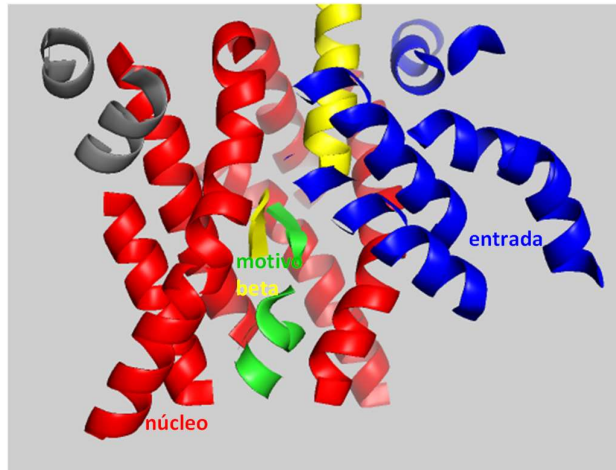


Figura 3-3: Modelo PhU. En rojo se representan los STM que constituyen el dominio denominado núcleo y en azul se representan los STM del dominio denominado entrada. En verde y amarillo se representan las hojas β y STM que forman el motivo β antiparalelo. Los STM se representan como cintas y las hojas β se representan como flechas. Para mayor claridad se omitieron los loops entre los STM. En la figura se representa solamente el modelo PhU^{UapA} ya que los resultados obtenidos con PhU^{UraA} son equivalentes.

Mediante el análisis del perfil electrostático se observó que para ambos modelos la distribución de los residuos ionizados en la superficie de la proteína es bastante razonable, la mayoría se colocan en el lado citoplasmático o lado extracelular o a lo largo del poro de la proteína en el interior de la proteína. Las cargas positivas se concentran principalmente en los bucles que miran hacia el citoplasma (Figura 3-4).

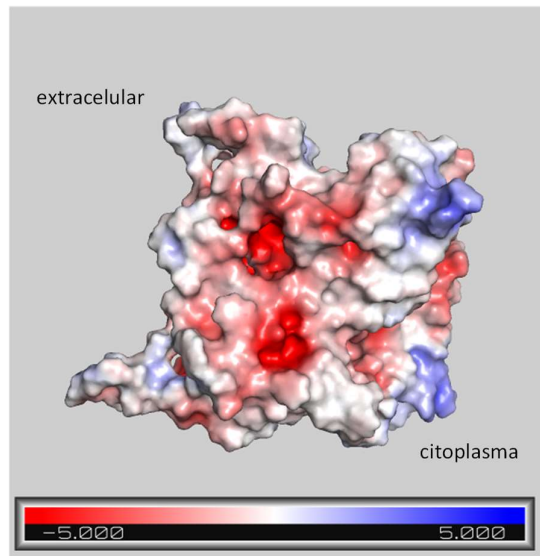


Figura 3-4: Perfil electrostático PhU^{UapA}. Se destaca una zona de color rojo intenso de carga negativa que forma parte del poro de la proteína.

Cabe aclarar que tanto la región N-terminal de PhU (hasta P72), como los 29 residuos más C-terminales, no tienen una porción análoga en los extremos terminales de UraA ni

Análisis de PhU

de UapA, por lo que estas regiones no fueron consideradas en los modelos. Respecto al modelo PhU^{UraA} también es importante señalar que, debido a la cantidad de inserciones necesarias para alinear las dos secuencias, la incerteza del modelo es mayor en la primera región (hasta P280) y en la porción que va desde, aproximadamente, Y490 hasta el C-terminal. Sin embargo, la mayoría de estas inserciones se encuentran en las regiones de *loop* que conectan los diversos STM, por lo tanto, es esperable que los STM estén razonablemente descritos.

Los 29 residuos identificados como críticos (para la función de UapA) presentan la misma ubicación en el modelo de PhU que en UapA. Entre ellos analizamos en detalle los ocho residuos que al comparar PhU y UapA no están conservados (Figura 3-2). A120 de PhU (A120^{PhU}) al igual que Q113 de UapA (Q113^{UapA}) se encuentra en STM2, cerca de S458^{PhU} que al igual que A441^{UapA} se encuentran en la hélice interna entre STM11 y STM12 (Figura 3-5a). En las hojas β anteriores a STM3 y STM10 que forman el motivo β antiparalelo se encuentran V157, T159, S421 y I422 al igual que los respectivos residuos de UapA: M151, V153, T404 y T405 (Figura 3-5b y c). El residuo R486^{PhU} se encuentra en el STM12 al igual que su análogo A469^{UapA} (Figura3-5d). P546^{PhU} se encuentra en el extremo del STM14b (región C-terminal de STM14; este segmento es una hélice transmembrana discontinua), lo mismo ocurre en UapA y el residuo G527 (Figura3-5e). En el modelo realizado utilizando como molde UraA, todos estos residuos están ubicados en la misma posición, excepto A120 que se encuentra en un *loop* entre STM1 y STM2 (Figura 3-2).

Como es de esperar la estructura propuesta por el modelo PhU^{UapA} presenta pocas diferencias respecto a la estructura tridimensional deducida para el transportador de *A. nidulans* cristalizado. Las diferencias se encuentran en: i) STM13 en modelo PhU se encuentra dividido en dos segmentos, uno de 20 residuos (R₂₃-L₄₃) y otro de solo 3 residuos (I₄₃₇-D₄₃₉), mientras que en UapA este segmento es una hélice transmembrana entera de 18 residuos (R₄₇₈-L₄₉₆); y ii) la primer parte del STM14 en UapA es de 13 residuos (L₅₁₃-E₅₂₅) y en PhU es de 9 residuos (F₄₆₃-L₄₇₁).

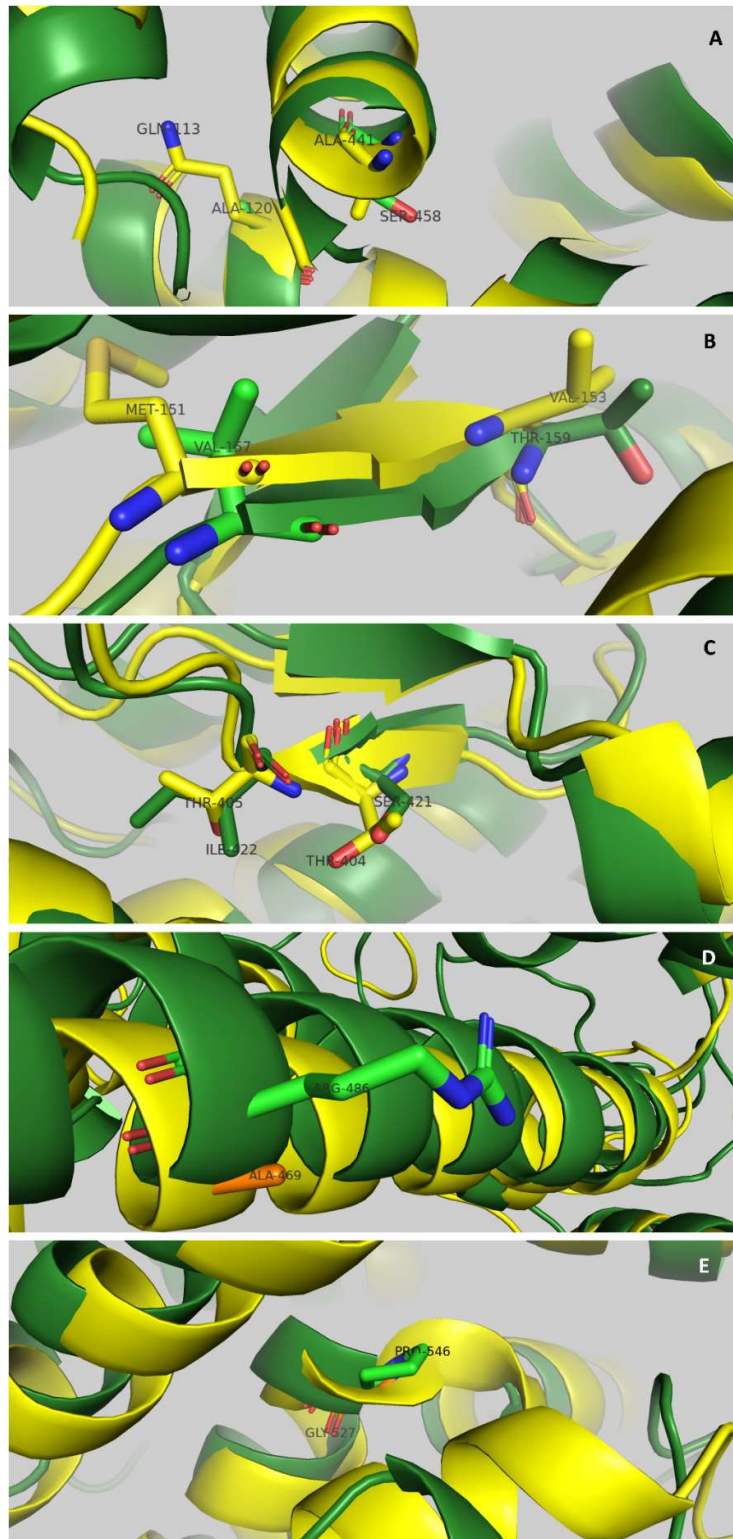


Figura 3-5: Se muestra un acercamiento a los residuos destacados. Alineamiento estructural, en verde se representa la estructura de PhU (PhU^{UapA}) y en amarillo la de UapA. A) A120 en STM2 y S458 en hélice interna 3 vs Q133 y A441. B) V157 y T159 en motivo beta antiparalelo vs M151 y V153. C) S421 e I422 en motivo beta antiparalelo vs T404 y T405. D) R486 en STM12 vs A469. E) P546 en STM14 vs A469. Los STM se representan mediante cintas y las hojas β mediante flechas.

Análisis de PhU

Usando el modelo PhU^{UapA} se abordaron aspectos del reconocimiento de sustratos mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*), utilizando el programa *Autodock tools* (Morris et al., 2009). Los dos sustratos principales de PhU, xantina y ácido úrico, se acoplaron a la estructura modelada (ver Sección 6.7.5). Las diez mejores conformaciones generadas con cada sustrato fueron analizadas y ordenadas en base al criterio de energía de interacción. Con xantina las 8 conformaciones con menor energía (-5,14 a -5,03 kcal/mol) definieron el *cluster* mayoritario (*cluster* 1). Las otras dos conformaciones conformaron un *cluster* cada una (-4,69, *cluster* 2 y -4,31 kcal/mol, *cluster* 3). Con ácido úrico las 10 conformaciones con menor energía de interacción quedaron agrupadas en dos *clusters*, el mayoritario integrado por las 8 conformaciones de menor energía (-5,42 a -5,36 kcal/mol, *cluster* 1) y otro *cluster* integrado por las 2 conformaciones de mayor energía (-4,35 y -4,34 kcal/mol, *cluster* 2). Los residuos de PhU que participarían de la interacción con el sustrato se analizaron mediante el programa LigPlotplus (Wallace et al., 1995) para las conformaciones de menor energía obtenidas para cada *cluster*, tanto con xantina como con ácido úrico (Figura 3-6 y Figura 3-7). Con ambos ligandos el análisis de la conformación del *cluster* mayoritario propone que los residuos que interaccionan con el sustrato formando enlaces de hidrógeno son E373, T159 y S160, agregándose A162 cuando se trata de ácido úrico. Con el segundo *cluster* los residuos candidatos son Q425, E373 y D377 con ambos sustratos. El análisis de la conformación obtenida con el tercer *cluster* de xantina propone que el sustrato interaccionaría con Q425, A96 y V429. Dado que estos últimos residuos no aparecieron representados en el caso de la interacción con ácido úrico esta conformación fue descartada y se seleccionaron para continuar con el análisis las otras conformaciones de xantina y ácido úrico obtenidas (*clusters* 1 y *clusters* 2).

La Figura 3-8 y Figura 3-9 muestran las interacciones de PhU con sus sustratos fisiológicos principales en el modelo generado (PhU^{UapA}), proponiéndose dos posibles orientaciones tanto para xantina como para ácido úrico. Según la orientación más favorable (desde el punto de vista de energía de interacción) PhU interaccionaría con sus sustratos a través de enlaces de hidrógeno mediados por las cadenas laterales de los residuos E373 (STM8) y S160 (motivo β), y el grupo carbonilo de T159 (motivo β). Según los modelos propuestos estos residuos interaccionan con N1 (H), N3 (H) y C2=O del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol cuando el sustrato es xantina. Con ácido úrico estos tres residuos interaccionan con N3 y C6=O del anillo pirimidínico y N2 (H)

del imidazol. En el caso del ácido úrico se agrega la interacción del grupo amino de A162 (STM3) que interacciona con C8=O del imidazol. Además, los anillos aromáticos de F161 (STM3) y F423 (*loop* entre hoja β y STM10) se sitúan “empaquetando” los sustratos (Figura 3-8 A y Figura 3-9 A).

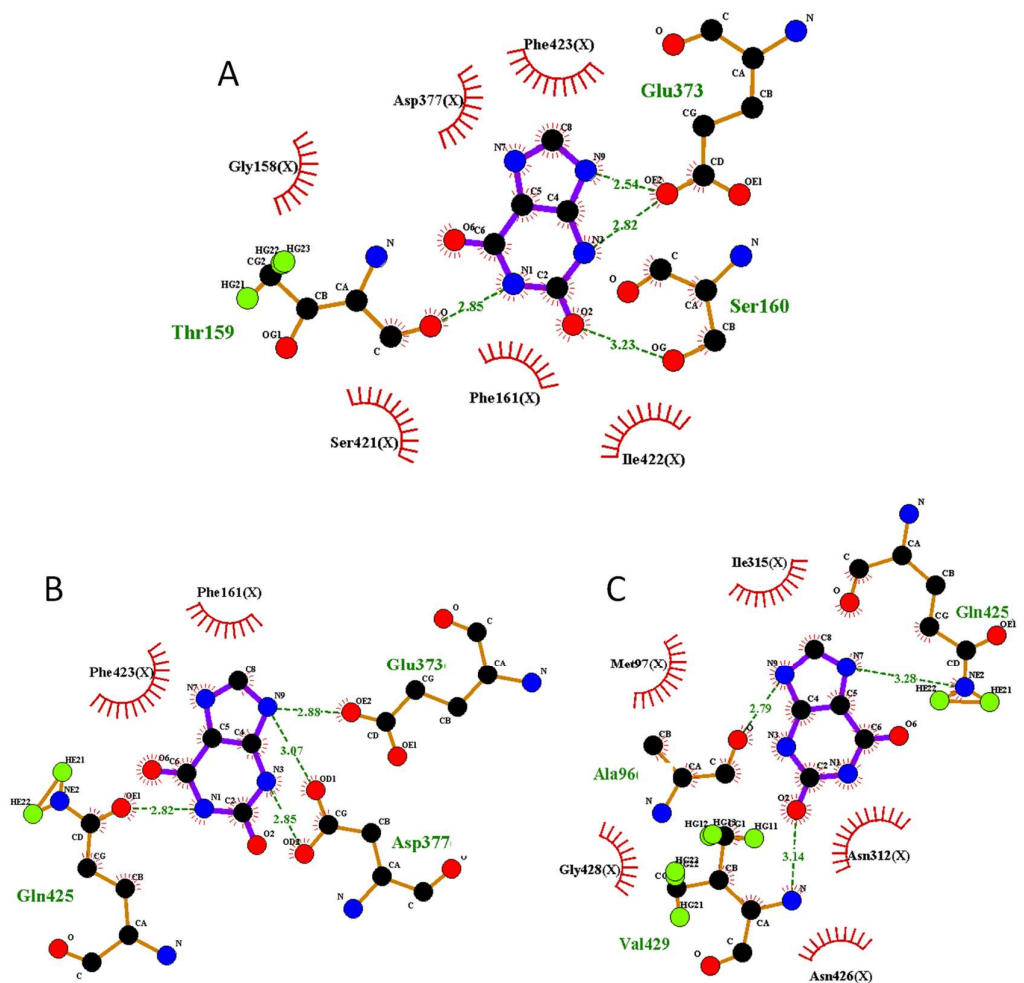


Figura 3-6: Interacción PhU-xantina. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de xantina que interaccionan con PhU obtenidas mediante Autodock. A) *Cluster* 1, representado por 8 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,14 a -5,03 kcal/mol B) *Cluster* 2 representado por una conformación con -4,69 kcal/mol de energía de interacción. C) *Cluster* 3 representado por una conformación con -4,31 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rayadas se representan otras interacciones que participarían del mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión.

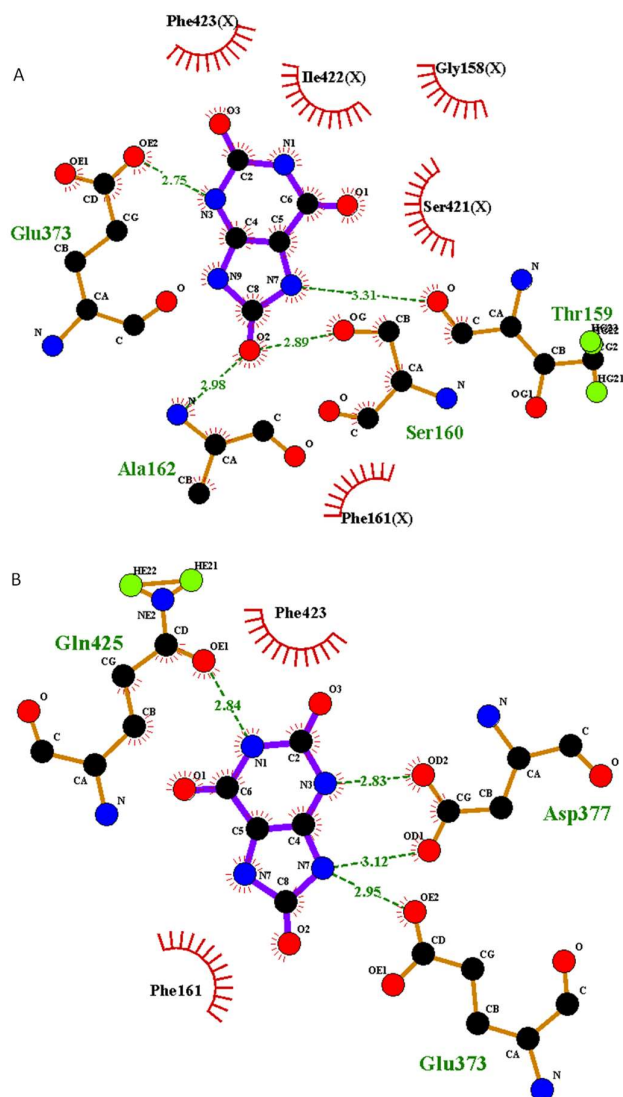


Figura 3-7: Interacción PhU-ácido úrico. Análisis obtenido mediante el programa Ligplotplus de las conformaciones de ácido úrico que interactúan con PhU obtenidas mediante Autodock. A) *Cluster 1*, representado por 8 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,42 a -5,36 kcal/mol. B) *Cluster 2* representado por 2 de 10 conformaciones con -4,35 y -4,34 kcal/mol de energía de interacción. Los enlaces de hidrógeno y su distancia se representan mediante líneas punteadas verdes. Mediante líneas curvas rojas rayadas se representan los residuos involucrados en interacciones hidrofóbicas.

La otra orientación propuesta tanto para xantina como para ácido úrico implica la interacción de los sustratos con las cadenas laterales de Q425 (STM10), E373 (STM8) y D377 (STM8) que según los modelos propuestos forman enlaces de H con N1 (H) y N3 (H) del anillo pirimidínico y N9 (H) del imidazol. En este caso también los anillos aromáticos de F161 y F423 quedarían “empaquetando” los sustratos (Figura 3-8 B y Figura 3-9 B).

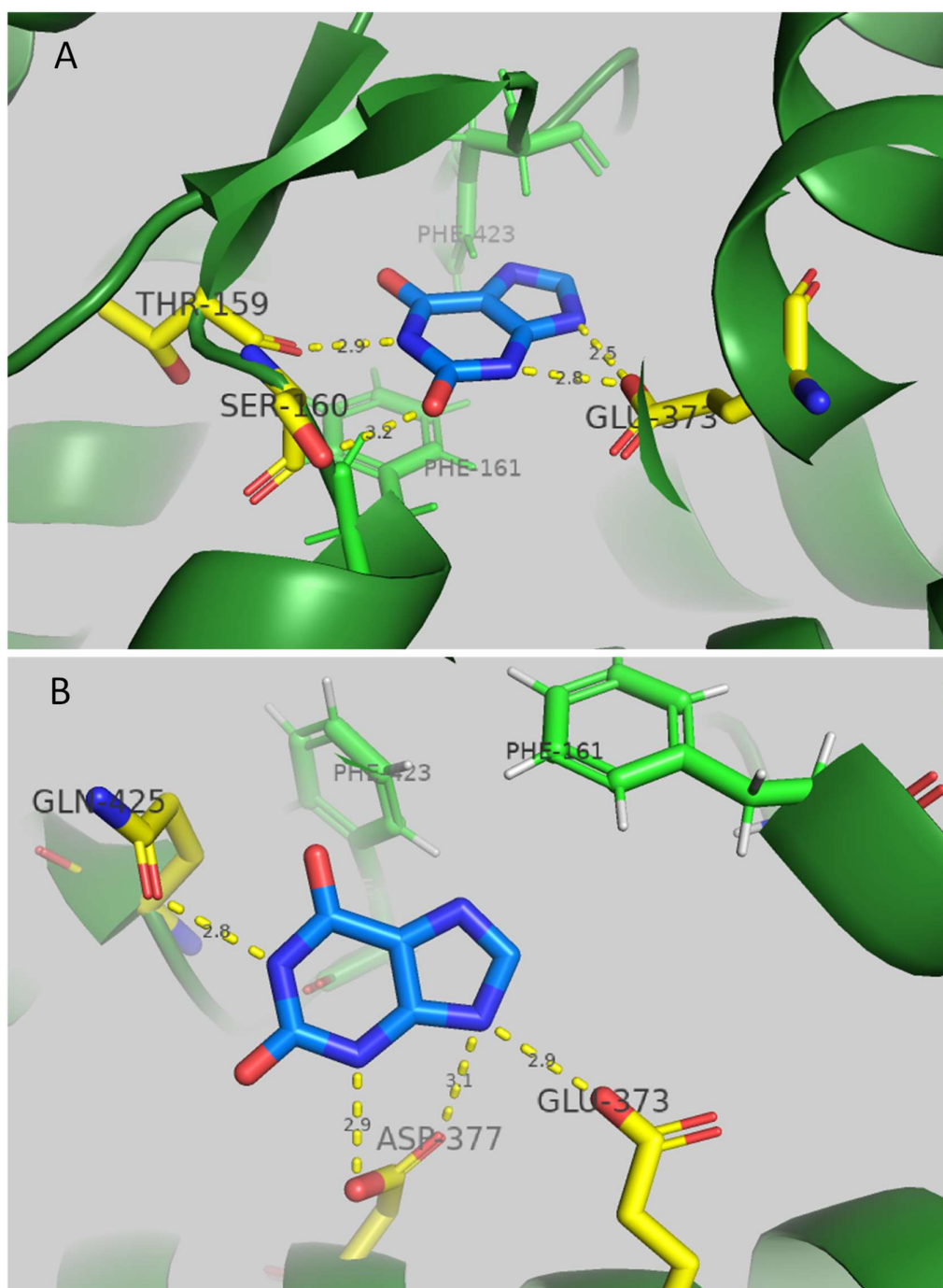


Figura 3-8: Interacción PhU-xantina obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (docking). En amarillo se marcan los residuos que interactúan con el sustrato mediante enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno se marcan mediante líneas punteadas amarillas, con la correspondiente distancia de enlace. Los residuos involucrados en interacciones hidrofóbicas se representan en verde. A) La disposición de la molécula de xantina representa el *cluster 1*, definido por 8 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,14 a -5,03 kcal/mol. B) La disposición de la molécula de xantina representa el *cluster 2* definido por una conformación con -4,69 kcal/mol de energía de interacción. Los STM se representan como cintas y las hojas β como flechas.

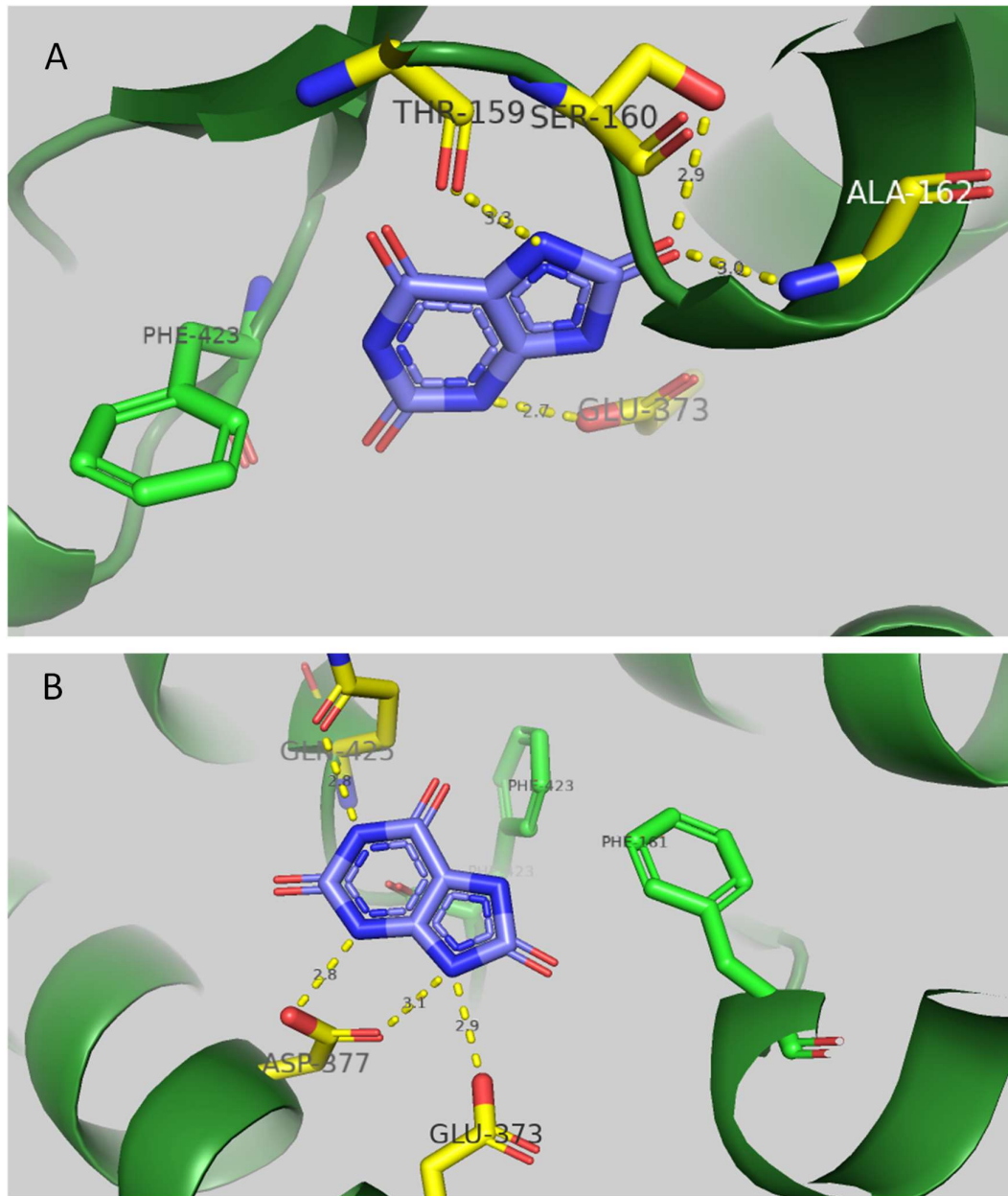


Figura 3-9: Interacción PhU-ácido úrico obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* (docking). En amarillo se marcan los residuos que interactúan con el sustrato mediante enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno se marcan mediante líneas punteadas amarillas, con la correspondiente distancia de enlace. Los residuos involucrados en interacciones hidrofóbicas se representan en verde. A) La disposición de la molécula de ácido úrico representa el *cluster 1*, definido por 8 de 10 conformaciones con energía de interacción -5,42 a -5,36 kcal/mol. B) La disposición de la molécula de ácido úrico representa el *cluster 2* definido por 2 de 10 conformaciones con -4,35 y -4,34 kcal/mol de energía de interacción. Los STM se representan como cintas y las hojas β como flechas.

3.3.3 Generación de cepas de *A. nidulans* que expresen versiones mutantes de PhU.

Para generar las cepas de *A. nidulans* con los cambios de PhU: A120Q, S458A y P546G cada mutación se generó *in vitro*, y se introdujo en *A. nidulans* utilizando un *cassette* de transformación que contiene: el gen *phU* mutado fusionado a la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (*gfp*), un gen de selección (*riboB*), y secuencias 5' y 3' UTR de *azgA* de *A. nidulans* (*5'UTR_azgA::phU_mutado::gfp::riboB::3'UTR_azgA*), para dirigir la integración al locus *azgA*. Para la construcción de los *cassettes* se unieron mediante PCR de fusión dos fragmentos amplificados sobre ADN_g de una cepa de *A. nidulans* portadora del *cassette* con *phU* silvestre (ver Sección 6.5.18).

El *cassette* portador de la mutación que codificaría la versión de PhU con la sustitución S458A no se pudo sintetizar ya que en este caso solo fue posible obtener uno de los dos fragmentos necesarios para la fusión (fragmento 3' de ≈4400 pb). Se ensayaron varias condiciones de amplificación: tiempo de elongación, gradiente de temperatura de *annealing* (58°C, 60°C y 65°C) y diferentes concentraciones de DMSO (3%, 6%, 10%) para obtener el fragmento con el 5'UTR y parte del gen *phU*, pero no fue posible obtener el amplicón deseado. Otras variables como la calidad del ADN molde, los dNTPs y la enzima utilizada no fueron consideradas como posibles causas de la ausencia de amplificación ya que se utilizaron las mismas en las reacciones de PCR que sí funcionaron. Se analizaron y compararon las características termodinámicas de los *primers* utilizados (longitud, T_m, % G+C, ΔG de formación de dímeros y horquillas, distancia de la mutación con el extremo 3') pero no se encontró nada que pudiera explicar los resultados obtenidos.

Los *cassettes* sintetizados (A120Q y P546G) fueron purificados y utilizados para transformar la cepa *ΔZAC::pyrG Δnku::argB riboB2 pyroA4 pabaA1* (MV60). Los transformantes se seleccionaron en medio carente de riboflavina, en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y amonio (este último como fuente de nitrógeno). Se obtuvo un total de 10 transformantes: 3 para el mutante P546G y 7 para el mutante A120Q. Se verificó que las colonias aisladas fueran transformantes mediante la evaluación de auxotrofías: la incorporación del *cassette* complementa el requerimiento de riboflavina pero no de ácido p-aminobenzoico ni piridoxina). De esta forma se

Análisis de PhU

verificaron los 3 transformantes P546G y se descartó uno de los transformantes A120Q (A120Q_5), por presentar un crecimiento más lento.

El análisis de crecimiento en distintas purinas y análogos tóxicos de las mismas (Figura 3-10), mostró que todas las cepas con la mutación P546G muestran un comportamiento similar a la cepa receptora (ΔZAC): no pueden crecer utilizando purinas como fuente de nitrógeno y crecen en presencia tanto de análogo tóxico 8-azaguanina como de oxipurinol. Los transformantes con la mutación A120Q, mostraron un comportamiento similar al de la cepa con PhU silvestre (pueden crecer utilizando ácido úrico como fuente de nitrógeno, en hipoxantina crecen mejor que la cepa receptora y son resistentes a la 8-azaguanina), con la excepción de que presentan resistencia parcial al oxipurinol (similar a la observada para UapA) y crecen mejor en ácido úrico.

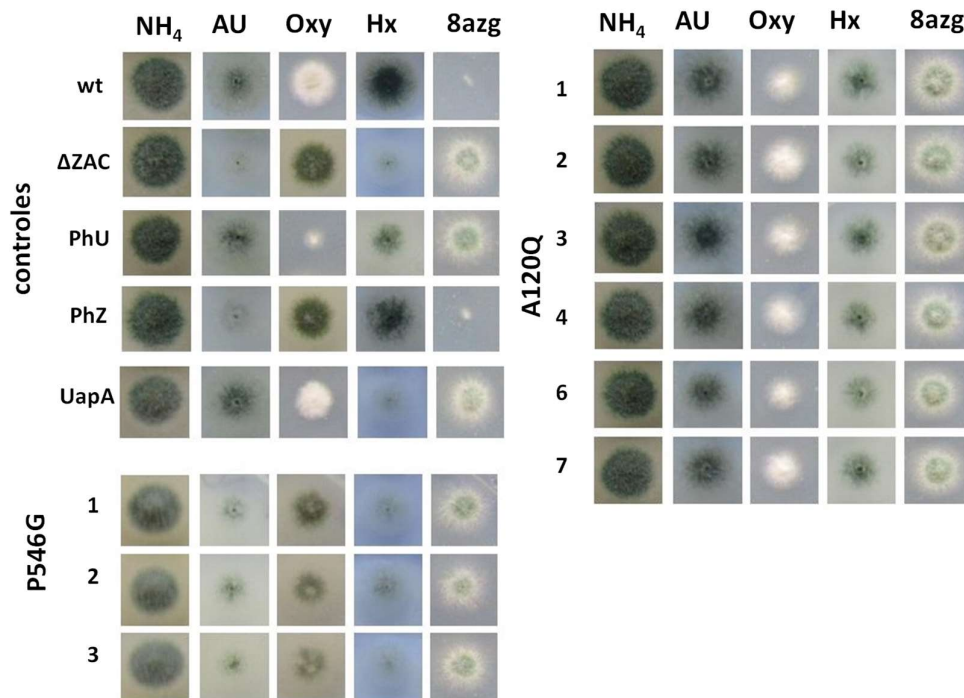


Figura 3-10: Análisis de crecimiento en placa de los transformantes obtenidos: Las cepas de *A. nidulans* se crecieron por 48 hs a 37°C en distintas fuentes de nitrógeno: amonio (NH₄), ácido úrico (AU), hipoxantina (Hx), y análogos de purinas tóxicos: Oxipurinol + nitrato (Oxy) y 8-azaguanina + amonio (8azg). Todas las condiciones se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. Wt: *pabaA1* (control); ΔZAC : *$\Delta ZAC::pyrG \Delta nku::argB riboB2 pyroA4 pabaA1$* (control); PhU: *$\Delta ZAC::phu::gfp::riboB$* (control); PhZ *$\Delta ZAC::phz::gfp::riboB$* (control,); UapA *$\Delta ZAC::uapA$* (control,); P546G_1-3: transformantes para la mutación P546G ; A120Q_1-7: transformantes para la mutación A120Q.

La presencia de la mutación deseada en los transformantes que incorporaron el *cassette* se analizó mediante la amplificación y secuenciado de todo el gen *phU* (ver Sección 6.4).

Análisis de PhU

El análisis de las secuencias mostró que las 3 cepas P546G incorporaron el cambio deseado. En el caso de las cepas A120Q este análisis mostró que todas tenían la mutación deseada pero además en los 6 transformantes analizados se encontró una mutación adicional en el nucleótido 1706 (adenina a guanina) que cambia el aminoácido 569 de glutamato a glicina debido a la mutación. Por tanto, las 6 cepas analizadas son dobles mutantes A120Q/E569G.

Se determinó el número de copias del gen *phU* presente en cada mutante mediante qPCR (ver Sección 6.5.16), corroborándose que todos los mutantes analizados poseen una única copia del gen *phU*.

El hecho de que las distintas variantes de PhU generadas se encuentran fusionadas a la GFP permitió seguir su localización subcelular por microscopía de fluorescencia. Se analizaron las 6 cepas con las mutaciones A120Q/E569G y las 3 cepas con la mutación P546G luego de la germinación, (Figura 3-11).

Las cepas que presentan la mutación A120Q mostraron el mismo patrón del transportador silvestre: La fluorescencia se localiza en la membrana plasmática y también se observa fluorescencia en vacuolas. Sin embargo, en el caso de las cepas con la mutación P546G el transportador no alcanza la membrana, la fluorescencia se ve asociada a vacuolas y anillos citoplasmáticos que se corresponderían con el RE.

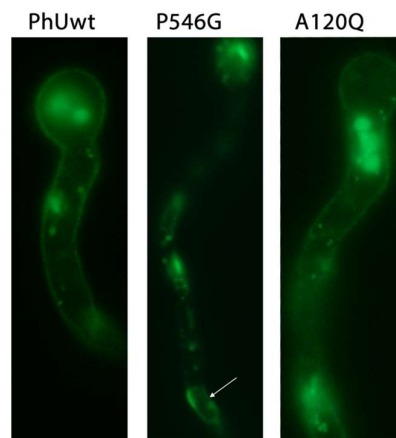


Figura 3-11: Localización subcelular *in vivo* de mutantes de PhU por microscopía de epifluorescencia. Como control se incluyó la cepa $\Delta ZAC::phU$ (PhUwt) que también expresa el transportador fusionado a la proteína verde fluorescente. En el control se observa fluorescencia en membrana y vacuolas (patrón ya determinado en Barraco et al. 2017). Las 6 cepas con la mutación A120Q y las 3 cepas con la mutación P546G mostraron el mismo patrón que se ejemplifica en la figura. Para cada mutante se analizaron 10-15 campos, para todos los casos se observó un mismo comportamiento, seleccionando por lo tanto una imagen representativa. La flecha indica membranas intracelulares que se corresponderían con el retículo endoplasmático.

A partir de estos resultados se seleccionó una cepa con la mutación P546G y una con las mutaciones A120Q/E569G y se realizaron ensayos de transporte con xantina marcada radioactivamente (^3H -xantina, Figura 3-12). Estos resultados muestran que el doble mutante A120Q/E569G transporta xantina al mismo nivel que la proteína silvestre y en el mutante P546G no se detecta transporte de xantina ya que el valor de velocidad inicial obtenido queda por debajo del valor de fondo determinado con la cepa ΔZAC .

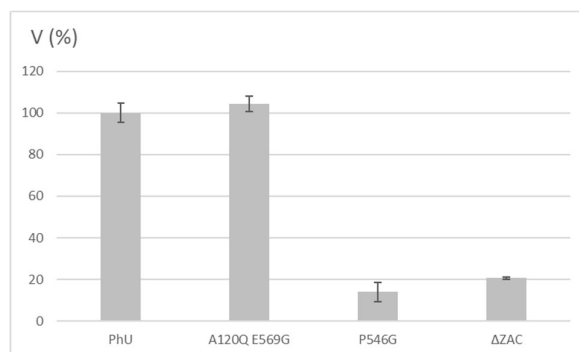


Figura 3-12: Velocidad inicial de transporte de ^3H -xantina en mutantes de PhU y cepas controles. 100% se considera como la tasa de transporte en la cepa que expresa PhU silvestre. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes cada uno medido por triplicado. En todos los casos la desviación estándar fue $<20\%$.

3.4 Discusión y Perspectivas

Se analizaron y compararon dos modelos tridimensionales para la proteína PhU uno utilizando como molde el cristal del transportador de *E. coli* UraA (PhU^{UraA}) y otro utilizando el cristal de UapA (PhU^{UapA}). Se verificó que ambos plantean una estructura con muy pocas diferencias a pesar de haber sido construidos en base a proteínas que presentan diferentes porcentajes de similitud con el transportador de *P. chrysosporium*. Dado que PhU presenta mayor similitud de secuencia con UapA que con UraA se decidió continuar con el modelo PhU^{UapA} para analizar los residuos seleccionados. Mediante este modelo se plantea una estructura tridimensional de PhU que, a pesar de las pocas diferencias con la estructura de UapA, presenta un sitio principal de unión al sustrato diferente al de la proteína de *A. nidulans*. De los dos posibles sitios de unión analizados

en este trabajo (*cluster 1* y *cluster 2*), el *cluster 1* parece ser el sitio principal de unión por ser la conformación más favorable desde punto de vista energético, la más representada (*clusters* mayoritarios) y por ser la que plantea una conformación del sustrato donde la interacción con el ácido úrico y la xantina son diferentes, lo que respalda los resultados experimentales previamente obtenidos. En Barraco-Vega, 2017 se determinó que las cepas AN::*phU* al igual que AN::*uapA* pueden crecer en xantina y ácido úrico, lo que es indicativo de que PhU transporta estos sustratos. Mediante experimentos de crecimiento donde se estudió la capacidad de estas purinas de proteger frente a la toxicidad del oxipurinol (análogo transportado por PhU y UapA) se determinó que: 7 μM de xantina es suficiente para lograr protección total con ambos transportadores, mientras que con 70 μM de ácido úrico se logra protección total con UapA pero con PhU sólo se logra protección parcial. Estos resultados indicarían que PhU transporta mejor la xantina que el ácido úrico. A partir del conjunto de estos resultados se propone que el sitio principal de unión al sustrato estaría formado por E373 (STM8), T159 y S160 (motivo β), agregándose A162 (STM3) cuando se trata de ácido úrico. Según nuestro modelo cuando el sustrato es xantina (Figura 3-8 A) las cadenas laterales de los residuos E373 y S160, y el grupo carbonilo de T159 formarían enlaces de hidrógeno con N1, N3 y C2=O del anillo pirimidínico y N9 del imidazol. Cuando el sustrato es el ácido úrico (Figura 3-9 A) E373, T159 y S160 interactúan con N3 y C6=O del anillo pirimidínico y N2 del imidazol y el grupo amino de A162 interactúa con C8=O del imidazol. Además, los anillos aromáticos F161 y F423 se sitúan “empaquetando” los sustratos.

Al comparar este sitio de unión al sustrato con el propuesto para UapA se puede observar que tienen semejanzas. El residuo análogo a E373 de PhU en UapA es E356, cuya cadena lateral también interactúa con el sustrato en el modelo propuesto para UapA-xantina (Alguel et al., 2016). Este glutamato es un residuo absolutamente conservado entre las proteínas NAT (Figura 3-2).

La T159 tiene como residuo análogo en UapA a V153, cuyo grupo carbonilo también interactúa con la xantina en el modelo propuesto para esta proteína de *A. nidulans*. Al observar los residuos análogos en las otras proteínas NAT de función verificada se puede ver que hay otras que como PhU tienen treonina en esta posición (UapC, XanP), otras al igual que UapA tienen valina (XanQ y YgfU), otras tienen glicina (SNBT1 y Lpe1), si bien la mayoría tienen serina (Figura 3-2).

El análogo en UapA de la S160 de PhU es la S154. En el modelo actual propuesto para UapA a este residuo se le atribuye un rol relacionado a la interacción de los STM (Alguel

et al., 2016). Anteriormente se le había asignado un rol como determinante de la especificidad del transportador (Amillis et al., 2011), ya que la sustitución de este residuo por alanina (S154A) provocaba una reducción en la afinidad por el ácido úrico y la sustitución por asparagina (S154N) confería un aumento de la afinidad por xantina y uracilo. Al observar el resto de las proteínas NAT de función verificada se puede ver que al igual que PhU y UapA la mayoría tienen serina en esta posición; en unas pocas puede observarse en esta posición asparagina (XanQ), treonina (YgfU, SNBT1) o alanina (SVCT1, SVCT2) (Figura 3-2).

A162 tiene como residuo análogo en UapA a S156. La mutación S156A en UapA no presentó cambios con respecto a la proteína silvestre (Amillis et al., 2011). Al observar las otras proteínas NAT de función verificada se puede ver que al igual que PhU la mayoría tienen alanina en esta posición. El modelo presentado propone que el grupo amino de este aminoácido es el que interacciona con el sustrato. Parecería que en este caso cualquier aminoácido relativamente poco voluminoso podría interaccionar con el sustrato.

Respecto a la otra conformación de xantina y ácido úrico que se planteó en la interacción PhU-sustrato (*cluster 2*, Figura 3-8 B y Figura 3-9B), nuestra hipótesis es que, en algún momento de la trayectoria del sustrato, tanto la xantina como el ácido úrico quedan ubicados adoptando esta otra conformación donde el sustrato interacciona con E373, Q425 y D377. De esta forma si bien Q425 y D377 no formarían parte del sitio principal de unión al sustrato, participarían en la vía de translocación del mismo. El residuo análogo a Q425 en UapA es Q408 el cual forma parte del sitio principal de unión al sustrato propuesto para esta proteína de *A. nidulans*. El análogo de D377 es D360 de UapA, al que se le ha asignado un rol relacionado a la vía de translocación del sustrato (Alguel et al., 2016). Analizando diferentes mutaciones en los residuos E373, T159, S160 y A162 se podrá validar el sitio principal de unión al sustrato que aquí se propone. Para indagar sobre la trayectoria del sustrato y determinar los residuos que participan en la vía de translocación sería deseable realizar simulaciones de dinámica molecular. Con estos resultados y el análisis de mutantes en los residuos Q425 y D377 se podrá verificar la hipótesis planteada por la segunda conformación PhU-sustrato.

La T159, que según el sitio de unión al sustrato propuesto interacciona con el sustrato mediante enlaces de hidrógeno, fue uno de los ocho residuos seleccionados para analizar en este trabajo (Figura 3-13). Tres residuos de estos ocho: V157, S421 y I422 también

están ubicados en el motivo β antiparalelo (Figura 3-13) y aunque no interaccionan con el sustrato mediante enlaces, el modelo plantea que S421 e I422 formarían interacciones necesarias para el mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión. Las otras interacciones hidrofóbicas que propone nuestro modelo es mediante F161 y F423 que al igual que en el sitio de unión UapA-xantina (F155 y F406) se posicionan empaquetando el sustrato. El residuo V157 al igual que T159 se encuentra en la hoja β próxima al STM3. Al observar los residuos análogos en las otras proteínas NAT de función verificada se puede ver que PhU y UapC son las únicas que tienen valina en esta posición; en los otros transportadores hay metionina, lisina o glutamina. En UapA M151 se encuentra en el motivo β antiparalelo y versiones con este residuo mutado (M151V y M151I) tienen afectada la capacidad de transporte (Amillis et al., 2011; Kosti et al., 2012). Actualmente se le ha asignado un rol relacionado a la interacción de los STM (Alguel et al., 2016). Los mutantes de UapA en este residuo surgieron como mutaciones supresoras del efecto provocado por la mutación H86D, restableciendo la capacidad de crecimiento en ácido úrico que habían perdido las cepas con la histidina mutada (Amillis et al., 2011). Al analizar la estructura tridimensional propuesta para UapA se puede observar que si bien H86 y M151 están cerca, no están dentro de las distancias que explicarían una interacción. Esto podría indicar que la supresión del efecto provocado por la mutación H86D por las mutaciones M151V o M151I se da a través de una modificación topológica indirecta. Los residuos S421 e I422 se encuentran en la hoja β próxima al STM10. Los residuos análogos en UapA son T404 y T405 los cuales según el modelo planteado contribuyen con el mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión. Al observar los residuos análogos en las otras proteínas NAT de función verificada encontramos que en la posición de S421 la mayoría tienen treonina (como UapA), UapC y XanP tienen serina al igual que PhU (Figura 3-2). En la posición de I422 la mayoría de los transportadores tienen treonina o serina aunque en esta posición la variabilidad es mayor y hay otros residuos que están representados por una sola proteína (*e.g.* PhU es el único que tiene isoleucina en esta posición).

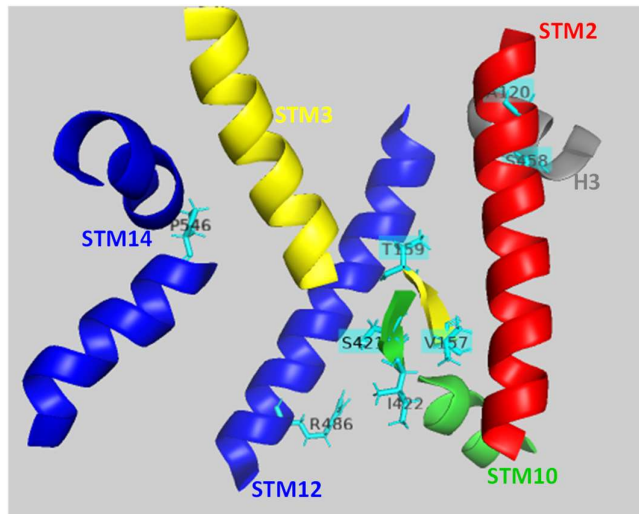


Figura 3-13: Se esquematiza la ubicación de los residuos de PhU analizados en este trabajo. Los STM se representan mediante cintas y las hojas β mediante flechas. Los residuos se muestran en turquesa.

Los otros 4 residuos seleccionados para analizar en este trabajo (A120, S458, R486 y P546) se encuentran ubicados en otras regiones del transportador, alejados del sitio de unión al sustrato propuesto (Figura 3-13).

El residuo A120 de PhU se encuentra en el STM2, en una posible región bisagra entre los dominios núcleo y puerta. Entre las proteínas NAT de función verificada hay algunas que como PhU tienen alanina en esta posición (XanQ, YgFU y Lpe1), otras que tienen glutamina (UapA, UapC y XanP) y otras tienen serina (PucJ, SVCT1, SVCT2 y SNBT1). En UapA el residuo análogo es Q113, al que se le ha asignado un rol relacionado a la especificidad de reconocimiento de sustratos. Cepas que expresan versiones mutantes con el cambio Q113L, aunque presentan afinidades de unión muy bajas (en condiciones no detectables) pueden transportar hipoxantina y, a determinadas concentraciones pueden crecer utilizando esta purina, sin verse afectado el transporte de xantina o ácido úrico. Cuando la mutación Q113L se combina con otras en residuos de diferentes regiones se logran versiones de UapA que transportan hipoxantina y adenina muy eficientemente (Q113L con Q408E, F406Y, F528S ó T526L) (Alguel et al., 2016; Kosti et al., 2010, 2012; Papageorgiou et al., 2008). Se han analizado otros cambios en este residuo: i) la mutación Q113K provoca pérdida de función del transportador ya que la proteína no pueda alcanzar la membrana, pero cuando la misma se sobreexpresa las cepas adquieren la capacidad de crecer en adenina y crecen mínimamente en ácido úrico o xantina; ii) la mutación Q113E genera una versión de UapA que tiene afectado el transporte de ácido úrico pero no de xantina (Papageorgiou et al., 2008).

Análisis de PhU

En este trabajo se analizaron 6 cepas que expresan la versión mutante de PhU con la sustitución A120Q, y verificamos que todas tienen una única copia del gen. Todas las cepas A120Q analizadas presentan una mutación adicional (E569G) que se encuentra en el *loop* más carboxilo terminal. Estos dobles mutantes A120Q/E569G, se localizan en membrana, tienen un nivel de transporte de H³-xantina y crecen en esta purina como la cepa que expresa el transportador silvestre, pero en ácido úrico crecen mejor y poseen resistencia parcial al oxipurinol (equivalente a la cepa que expresa UapA). Si bien no puede descartarse que una mutación suprima el efecto de la otra, parece muy poco probable que un residuo tenga incidencia sobre el otro: este residuo se encuentra próximo al extremo carboxilo terminal, zona de gran variabilidad que no fue considerada en el modelo (Figura 3-2). Si bien para descartar un efecto de modificación topológica indirecta sería necesario analizar las mutaciones por separado, para el análisis de este trabajo consideramos que el fenotipo de los mutantes puede atribuirse a la mutación A120Q. Por tanto, nuestros resultados indicarían que la mutación A120Q tiene un efecto en el transporte de ácido úrico y oxipurinol pero no afecta el transporte de xantina. Similar a lo que se obtiene con la mutación Q113E de UapA (Papageorgiou et al., 2008). Esto indica que A120 de PhU tiene un rol relacionado al reconocimiento de sustratos. Particularmente, este residuo determinaría la eficiencia con la que se transporta ácido úrico: si el mismo es glutamina el transporte de esta purina será mejor que si el mismo es alanina. Esto podría explicar porque en el mismo contexto metabólico las cepas que expresan UapA (tienen glutamina) transportan xantina y ácido úrico al mismo nivel, mientras que las que expresan PhU (tienen alanina) transportan xantina con mayor eficiencia que ácido úrico (Barraco-Vega et al., 2017). Para dar sustento a esta hipótesis sería interesante evaluar otras sustituciones en este residuo de PhU.

Respecto al residuo S458, el modelo propuesto para PhU lo localiza en la hélice interna entre STM11 y STM12 cerca de A120 en la posible región bisagra entre los dominios núcleo y puerta. En UapA el residuo homólogo es alanina (A441) al que se le ha asignado un rol relacionado a la especificidad de reconocimiento de sustrato. Al observar los alineamientos entre las proteínas NAT de función verificada se puede ver que en la posición de S458 hay algunas que como PhU tienen serina en esta posición (XanP, SVCT2), otras que como UapA tienen alanina (UapC, YgfU, PucJ, UraA) y otras que tienen glicina o treonina. Mutando este residuo en UapA se ha logrado ampliar el espectro de sustratos de UapA. Las cepas que expresan una versión de UapA con A441V no tienen

Análisis de PhU

afectado el transporte de sus sustratos fisiológicos y pueden crecer en hipoxantina, aunque presenta una baja afinidad por esta purina. Sin embargo, el mismo mutante no tiene afinidad por la adenina, a pesar de presentar capacidad para crecer en esta purina. Esto parecería indicar que la capacidad de transportar los sustratos no fisiológicos de este mutante se debe a un aumento en la capacidad de transporte *per se*, en lugar de un aumento en las afinidades de unión (Kosti et al., 2010). Si bien el análisis experimental del mutante S458A queda pendiente de verificación, nuestra hipótesis es que la diferencia en este residuo podría llegar a explicar por qué las cepas de *A. nidulans* que expresan PhU silvestre pueden crecer en hipoxantina.

El residuo R486 se localiza en STM12 según el modelo propuesto, en UapA el residuo homólogo es alanina (A469) al que se le ha asignado un rol en la vía de translocación del sustrato (Alguel et al., 2016). Al observar los alineamientos entre las proteínas NAT de función verificada se puede ver que en la posición R486, la arginina es el residuo más habitual pero también hay otros transportadores que tienen lisina (PucJ y PyrP) y otros que tienen serina (SVCT1, SVCT2, SNBT1 y Lpe1). UapA es el único transportador que tiene una alanina en esta posición (A469). Mutando este residuo en UapA se ha logrado ampliar el espectro de sustratos de este transportador. Las cepas que expresan una versión de UapA con A469E/V pueden crecer en hipoxantina (aunque presentan una baja afinidad por este sustrato), pero también el transporte de ácido úrico se ve afectado ya que la mutación afecta la afinidad de unión por este sustrato (K_i aumenta 8 veces) (Kosti et al., 2010). Si bien en este trabajo no nos planteamos el análisis experimental del mutante R486A una posible hipótesis es que las diferencias en estos residuos también podrían llegar a explicar porque la proteína de *A. nidulans* transporta xantina y ácido úrico al mismo nivel, mientras que la de *P. chrysosporium* transporta xantina con mayor eficiencia que ácido úrico (Barraco-Vega et al., 2017). En suma los datos bibliográficos sugieren que S458 podría incidir en la interacción con hipoxantina y R486 incidir en el transporte diferencial xantina-ácido úrico. Mediante el análisis experimental de los mutante S458A y R486A se podrá indagar sobre el rol de estos residuos de la proteína PhU.

Según el modelo el residuo P546 se encuentra en el STM14, en la interfase entre el dominio puerta y núcleo. Cuando se observan los alineamientos entre las proteínas NAT de función verificada se puede ver que esta zona presenta mayor variabilidad, la mayoría tienen glicina en esta posición (UapA, UapC, XanP, YgfU, PucJ, UraA, RutG y SNBT1), otros transportadores, al igual que PhU, tienen prolina (XanQ y Lpe1) pero también hay

otros que tienen serina, glutamato o alanina. La G527 que es el residuo análogo en UapA se encuentra entre T526 y F528, dos residuos claves para la especificidad de reconocimiento de sustratos. Mutando estos dos residuos se lograron versiones de UapA con el espectro de sustrato extendidos (Papageorgiou et al., 2008). La hipótesis inicial era que esta prolina en PhU (P546) podría provocar una arquitectura local diferente a la obtenida con T545 y F547 (análogos a T526 y F528 de UapA), de forma tal que se “relajara la especificidad” del transportador y esto llegara a explicar porque las cepas de *A. nidulans* que expresan PhU silvestre crecen mejor en hipoxantina que las cepas que expresan UapA. Analizamos 3 cepas con la mutación P546G y en todas se obtuvo pérdida de función del transportador. La mutación impide la localización de la proteína en la membrana plasmática, quedando retenida en lo que parece ser el RE (localización típica de transportadores que presentan defectos en su plegamiento (Diallinas, 2008a)). Este resultado va en concordancia con lo obtenido con el mutante G527V de UapA con el cual también se obtiene pérdida de función y retención en el RE cuando la expresión es a 37°C. Mientras que la cepa que expresa esta versión de UapA puede crecer en ácido úrico cuando la temperatura es 25°C (fenotipo criosensible) (Kosti et al., 2012). Sería interesante evaluar el crecimiento del mutante P546G de PhU a 25°C para determinar si el fenotipo observado es dependiente de la temperatura. Por otro lado, cabe aclarar que teniendo en cuenta el mecanismo de elevador propuesto para UapA si bien el STM14 no forma parte de los cambios conformacionales claves, se plantea que es posible que este segmento deba flexionarse para que el núcleo se mueva (Alguel et al., 2016). P546, entonces, sería clave para el mantenimiento de la arquitectura del transportador PhU.

3.5 Conclusiones

Se construyeron dos modelos tridimensionales de PhU por homología con dos transportadores cristalizados (UraA y UapA). Ambos proponen una estructura tridimensional de PhU que consiste en 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas, y un motivo β antiparalelo formado por una hoja β próxima al STM3 y otra próxima al STM10. Topológicamente la proteína se presenta agrupada en dos dominios uno más compacto (núcleo) y otro más flexible (puerta).

El modelo aquí presentado propone que PhU y UapA tienen la misma estructura tridimensional y diferentes sitios de unión al sustrato. El sitio principal de unión al

Análisis de PhU

sustrato de PhU estaría formado por E373 (STM8), T159 y S160 (motivo β), agregándose A162 (STM3) cuando se trata de ácido úrico. Cuando el sustrato es xantina las cadenas laterales de E373 y S160 y el grupo carbonilo de T159 formarían enlaces de hidrógeno con N1, N3 y C2=O del anillo pirimidínico y N9 del imidazol. Cuando el sustrato es el ácido úrico E373, T159 y S160 interaccionan con N3 y C6=O del anillo pirimidínico y N2 del imidazol y el grupo amino de A162 interacciona con C8=O del imidazol.

Con la estructura tridimensional modelada se analizaron ocho residuos (A120, V157, T159, S421, I422, S458, R486 y P546) que fueron seleccionados por presentar diferencias con los residuos reportados como críticos en el transportador de *A. nidulans* UapA. Entre estos ocho, cuatro están ubicados en el motivo β antiparalelo: uno (T159) interaccionaría directamente con el sustrato y dos (S421 e I422) formarían interacciones necesarias para el mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión. Los otros cuatro residuos de PhU analizados se encuentran ubicados en otras regiones del transportador, alejados del sitio de unión al sustrato propuesto: A120 en el STM2, S458 en la hélice interna del STM11-STM12, R486 en STM12 y P546 en STM14. Los resultados obtenidos muestran que A120 se encuentra, en una posible región bisagra entre los dominios núcleo y puerta y tiene un rol relacionado al reconocimiento de sustratos. Además, la evidencia experimental obtenida con el mutante A120Q permite suponer que la presencia de alanina o glutamina en esta posición determina la eficiencia con la que se transporta ácido úrico en estas proteínas.

Respecto a P546 se determinó que se encuentra en la interfase entre el dominio puerta y núcleo y sería clave para el mantenimiento de la arquitectura del transportador PhU.

Los resultados obtenidos en este capítulo utilizando como modelo el transportador de purinas tipo NAT del Basidiomycota *P. chrysosporium* son un aporte al modelo existente de esta familia de proteínas.

4 Análisis de PuZ

Transportador de purinas tipo *AzgA-like* de
Punctularia atropurpurascens

4.1 Introducción

Punctularia atropurpurascens (División Basidiomycotina, Orden Aphyllophorales, Familia Corticiaceae), es un hongo de pudrición blanca, nativo de nuestra región, productor de arthroconidias, cuya temperatura de crecimiento varía entre 20 y 37 °C. Al igual que *P. chrysosporium* puede crecer sobre madera aunque presentan diferencias respecto a las enzimas ligninolíticas y a la fase de crecimiento en que se producen (*P. atropurpurascens* no presenta el funcionamiento típico de las enzimas ligninolíticas). Ambos hongos pueden utilizar purinas como fuente de nitrógeno si bien presentan diferentes niveles de crecimiento en diferentes purinas (Figura 4-1). *P. atropurpurascens* crece mejor en adenina e hipoxantina que *P. chrysosporium*. Estos niveles de crecimiento podrían indicar diferencias en las enzimas del catabolismo, y también podrían ser consecuencia de transportadores específicos con diferente espectro de sustrato, afinidad y/o capacidad de transporte. *P. atropurpurascens* tiene un transportador de purinas homólogo a PhZ, al cual se lo denominó PuZ. Debido a que el genoma de este organismo no se encuentra secuenciado, el gen que codifica para PuZ (*puZ*) fue clonado mediante la amplificación con *primers* degenerados y RACE PCR (Barraco-Vega, 2014) obteniéndose la secuencia parcial del mismo (Figura 4-2), a partir de la cual se dedujo una secuencia aminoacídica de 494 residuos.

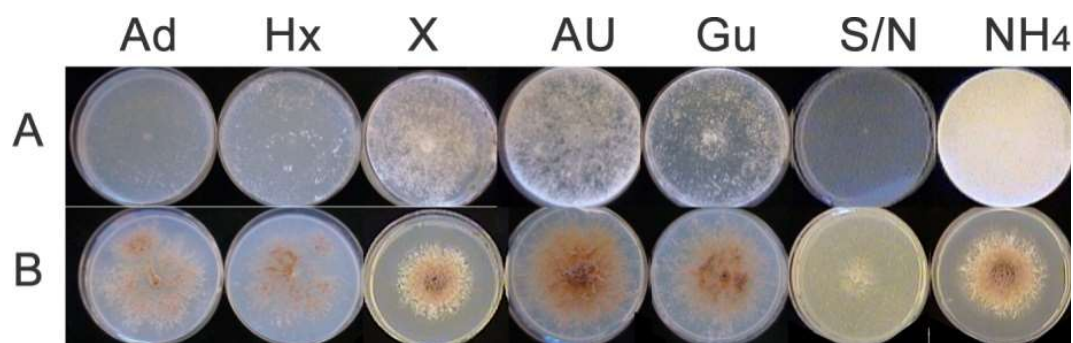


Figura 4-1: Crecimiento en purinas de *P. chrysosporium* (A) y *P. atropurpurascens* (B). Se muestra el crecimiento en el medio YCB en adenina (Ad), hipoxantina (Hx), Xantina (X), ácido úrico (AU), guanina (Gu) como fuentes de nitrógeno. Como control se incluye el crecimiento en amonio (NH₄) y sin fuente de nitrógeno (S/N). Tomado de (Barraco-Vega, 2014).

Análisis de PuZ

```

1  V E E V R Q D L I T T T A A V S A L A S C L M G L L A N L P I G L
   GTTAGAGGAGGTCGGCAGGATCTAATTACGACCACCGCGCGCTGTCGGCACTGGCGTCGCTTGATGGGCTTGTAGCCAACCTGGCCGACTGGACTCG
101  A P G L G L N A Y
   CGCCCGGTTGGGCTGAACGCATACgtgagttggttttttgttacttggcgtggggtccgctcgaggaccagggcattgctgtcaactgcaactagct
201  F T Y S I V G F H D S G Q
   cggggcgctcgctggttacagctccatctgagattgctgctgctaatcgacgatctgtaagTTCACGTATAGCATCGTGGGTTCCATGACTCGGGCCAG
301  I T Y Q E A L A A V F L E G W V F
   ATAACATATCAGGAAGCGCTCGCAGCCGTTTTCCTCGAAGGgcaagtttcttacttcactgtctctgttctatcttctgaccccatgaaagCTGGGTGTTG
401  V I L S L L G L R Q W L A R I M P Q S L V L A V G A G I G L F I A F
   TCATATTGTCGCTCCTGGGCTTCGCAATGGCTAGCGCTATCATGCCGAGTCCTTGATTTGGCCGTTGGCCGCTGGCATCGGCTTGTATTATCGCCTT
501  I G L N G G L F V I
   CATCGGCTATgtgagcatttgggtgacgccaatgtggggatattgggtgctgactccgttttccccctctgctgaagCAATGGCGGCTTTTCGTGATC
601  G G D Q T N F V G L G G C K T E
   GGTGGCACCAGACGAATTCGTTGGCCTTGGAGGTTGCAAAACGGAAGgtaccggtgcccgtctcttctgattttccatcggaacttttttaggctgccc
701  D Q F A N L S G Y C E H G V L Q L P T M W L G I F C G G
   tgacaacataatgagATCAATTCGGCAACCTCTCTGGCTATTGCGAGCATGGCGTCTCCAGCTTCCAACGATGGCTCGGCATCTTCTCGCGGGAA
801  I L T L L L M L Y R V K G A I L I G I F L V S I I S W P R P T S V T
   TCCTGACATGTCTCATGCTTACC CGGTTAAAGGCGGATCCTCATCGGCATCTTCTCGTCTCCATCATCTCTGGCCCCGTCGACGTCGCTTAC
901  A F P H T P T G D T A F E F F K K V V T F R P L K R V G N V L D Y
   CGCCTCCCGCATACGCCACCGGTGACACCGCTTCGAGTTCCTCAAGAAGGTCGTCACTTCCGCGCGTTGAACCGCTCGGCAACGCTGCTCGACTAC
1001  H Y G N G R V W Y A L V T F L Y V D I L D T T G T L Y S M A K F A
   CACTACGGCAACGGCCGGGCTCGGTACGGCTCGTCACTTCTCTACGTCGACATCCTCGACACGACGGGCACTCTCTACTCGATGGCCAAGTTTGGCG
1101  G L R D P V T L D F E R S T V A Y C V D A F S I S M G A L M G T S P
   GCTTGGCGACCCGGTCAAGCTCGATTTTCGAGAGGACGAGTCCGCTACTGCGTCAAGCGGTTCTCGATCAGTATGGGCGGCTTGTATGGCCACCGCC
1201  V T A F I E S A T G I S
   TGTGACGGCTTTCATCGAGAGCGCCACCGCATTTCCGgtatgctgtgcccgtgatccgaggggagggttttggctgacggatgtttcttgtggogaata
1301  E G G R T G I T A I T T G L M F F V S V F F A P I F A S I P P W A
   gAGGTTGGACGGACAGGTATCACCGGATCACGACGGGCTCATGTTCTTCTCGTCAAGCTCTTCTTCCGCCCTATCTTCGCTTCCATACCCCTTGGGCGA
1401  T G S A L V I V G C L M I R N V K E I N W D Y V G D A I P A F L T I
   CCGGAAGTCCGCTCGTATCGTGGCTGCTTGTATGATCCGCAACGTCAAGGAGATCAACTGGGACTACGTCGCTGACGCAATACCCGCTTCTCGACCAT
1501  I I I P L S Y N I A Y G I I A G L G S Y I A I N G P A W I L M K I
   CATCATATCCCTCTGCTGACAACTCGGTCACGGCATCATCGCCGCTGGGCTCCTACATAGCCATCAACGGCCCGGCTTGGATCCTCATGAAGATT
1601  S G G R I I P A H Y E Y S E E W I V P P G G L V P I W F Q K L T G
   TCCGGCGGACGTATTATCCCGCGCATTACGAATACTCGGAAGAGTGGATCGTCCACCGGGCGGCTTGTACCCATCTGGTTTCAAAGCTCACGGGGA
1701  R Y Q D P H L D P P Q E L Q S R Q E H S I D M A E S A H G D A L R Q
   GATATCAAGACCCACACTTGGACCCCGCAGGAGCTGCAGAGCCGACAAGAACACTCGATCGATATGGCCGAGTCTGGCACGGGGACGGCTCCGGCA
1801  K F E A T F R C G H P D N I I E Q F L G *
   GAAGTTCGAGGCGACGTTTCGGTGGGTCATCCGGACAACATCATGAACAATTTTGGGCTAA

```

Figura 4-2: Secuencia parcial de PuZ. La región marcada con la línea continua es la obtenida mediante *primers* degenerados y ST-PCR (*Semi-random, Two-step* PCR), donde los motivos pie de intrón se indican con subrayado. La región marcada con línea punteada es la obtenida mediante RACE 3' (Barraco-Vega, 2014).

Se determinó que la secuencia parcial de PuZ deducida presentaba alta similitud con las proteínas *AzG-like* de función verificada: 84%/75% con PhZ, 73%/57% con AzG, 71%/55% con *AfAzG*, 69%/50% con *AtAzg1* y 64%/44% con *AtAzg2* (similitud/identidad). Se identificaron 29 de los 34 residuos invariantes y tres de los cuatro motivos conservados característicos de la familia *AzG-like* y se determinó que el motivo

Análisis de PuZ

1 y los residuos invariantes F22, E41, M52, Y54, V58 se ubicarían en la región de la proteína sin determinar (Barraco-Vega, 2014).

En base al alto grado de similitud de la secuencia parcial con el transportador de *P. chrysosporium* se planteó de que, comparando el perfil de sustratos transportados por ambas proteínas en el mismo contexto genético y por tanto metabólico, se podrían identificar residuos candidatos como críticos para la función de las proteínas *AzgA-like*.

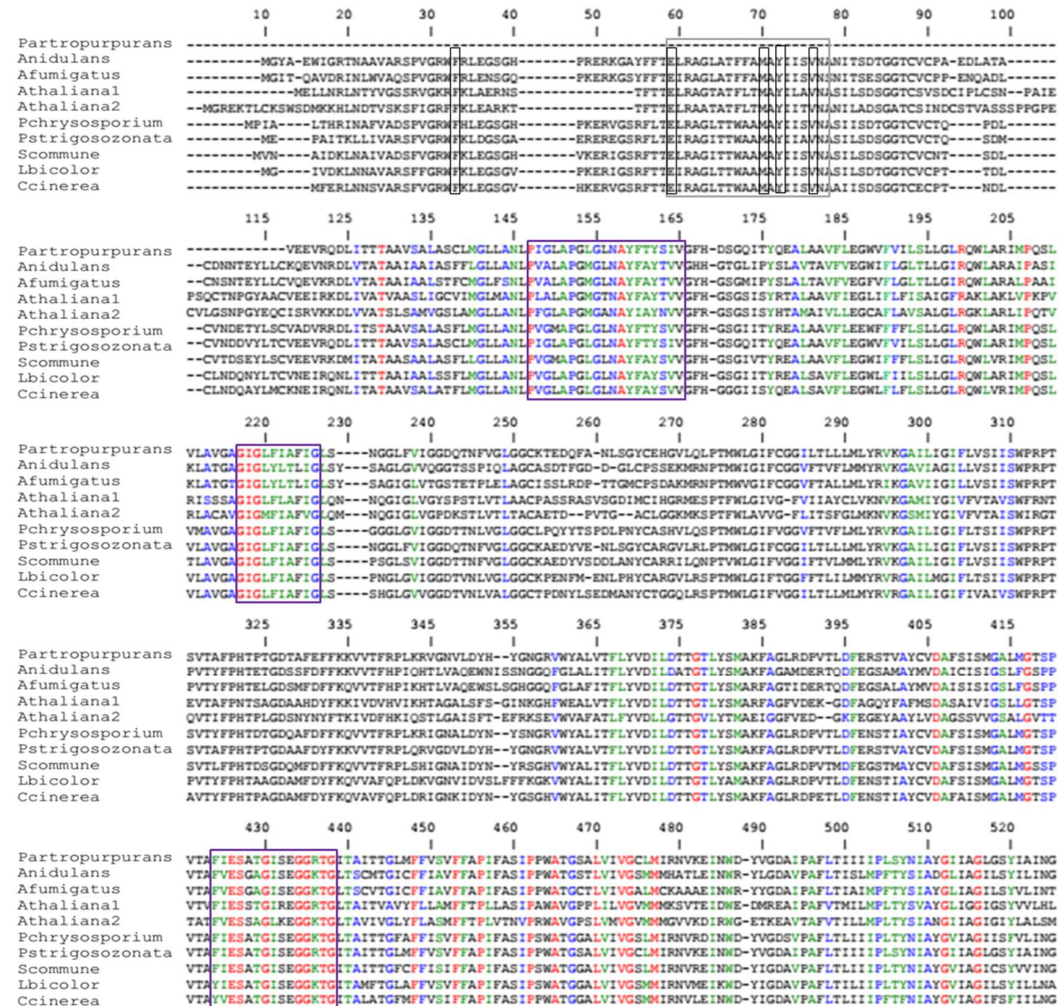


Figura 4-3: Alineamiento PuZ y homólogos *AzgA-like*. Alineamiento mediante *ClustalW* de la secuencia parcial de la proteína de *P. atropurpurascens* (PuZ), *AzgA-like* de función conocida y 144 proteínas hipotéticas. (Barraco-Vega, 2014). Para mejor visualización sólo se muestra la secuencia de PuZ, proteínas *AzgA-like* de función conocida y 4 proteínas hipotéticas de Basidiomycotas: *Schizophyllum commune*, *Laccaria bicolor*; *Coprinopsis cinerea*, y *Punctularia strigosozonata*. Los residuos invariantes se muestran en rojo. Los motivos conservados se muestran recuadrados en negro. En recuadro gris se indica el motivo ubicado en la región de PuZ no determinado y en negro los residuos F22, E41, M52, Y54, V58. En la figura se omitieron los residuos de la posición 526-631 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Tomado de (Barraco-Vega, 2014).

4.2 Objetivos del capítulo

4.2.1 Objetivo general:

Aportar a la consolidación de un modelo estructural de proteínas de la familia *AzgA-like* sustentado en evidencias biológicas.

4.2.2 Objetivos específicos:

- i. Identificación de la secuencia completa del gen *puZ* de *P. atropurpurascens* y clonado de la secuencia codificante.
- ii. Expresión de PuZ en *A. nidulans* (mismo contexto genético que PhZ).
- iii. Análisis del perfil de sustratos transportados e identificación de residuos críticos para la función de las proteínas *AzgA-like*.

El análisis de la proteína PuZ de *P. atropurpurascens* se planteó con el objetivo de determinar si los pocos residuos en que se diferencia de PhZ podrían ser responsables de diferencias observadas en el transporte de purinas (Barraco-Vega, 2014; Figura 4-1). Nuestra hipótesis era que en función de los resultados obtenidos se podrían seleccionar nuevas mutaciones a introducir en PhZ. Al comienzo de este trabajo disponíamos de una secuencia codificante parcial de PuZ (aproximadamente 500 residuos), obtenida por amplificación con *primers* degenerados y RACE PCR (*Rapid amplification of cDNA ends*). Para el clonado de la secuencia correspondiente a los aproximadamente 100 residuos del extremo N terminal faltantes, se utilizaron *primers* específicos de la secuencia conocida y *primers* degenerados dirigidos a la región ATG desconocida. Éstos últimos se diseñaron con mayor sesgo en función de la secuencia de un gen de otra especie de *Punctularia* (*P. strigosozonata*) cuya secuencia genómica está disponible y presenta muy alta homología con *puZ*. El ADNc completo del gen silvestre se introdujo en *A. nidulans* utilizando el sistema de cepa receptora y de construcción de *cassettes* explicado en los capítulos anteriores.

4.3 Resultados

4.3.1 Identificación de la secuencia del gen *puZ*

El clonado de la región 5' de los genes *AzgA-like* fue un desafío ya observado con el primer gen de la familia, *azgA* de *A. nidulans*, y luego con *phZ*. Éstos presentan mayor dificultad a la hora del clonado, secuenciado, amplificación de la región 5', y *puZ* no fue la excepción. La primera estrategia utilizada para completar la secuencia del gen *puZ* fue la técnica de RACE que permite amplificar el extremo 5' (Yeku & Frohman, 2011) utilizando *primers* diseñados a partir de la secuencia de *puZ* conocida (puZ-qR6, puZ-qR16, puZ-qR17, puZ-qR18) (Figura 4-4). Ninguno de los clones obtenidos mediante RACE coincidió con el amplicón esperado y por eso fue necesario cambiar de estrategia. Se amplificó a partir de ADNg y ADNc (sintetizado a partir de ARNm producidos en condiciones de inducción del gen *puZ*: medio mínimo, químicamente definido sin fuente de nitrógeno), combinando *primers* específicos de la secuencia conocida y *primers* degenerados dirigidos a la región desconocida. Para el diseño de los *primers* degenerados se realizaron alineamientos con secuencias de otros transportadores hipotéticos deducidos del genoma de basidiomicetes secuenciados. Además, se diseñaron otros *primers* en base a la secuencia del gen homólogo a *puZ* del Basidiomycota *Punctularia strigosozonata* (cercanamente relacionado a *P. atropurpurascens*). Debido a que el primer exón de este gen en *P. strigosozonata* es de 5 pares de bases de longitud (ATGGA) se diseñaron 2 *primers* (PsZF1 y PuZdegF11) considerando la secuencia del segundo exón de 25 pb de longitud y otros 2 *primers* (PsZF2 y PuZdegF17) considerando la secuencia del tercer exón de 85 pb. De modo que el fragmento amplificado no incluiría el ATG inicial ni los 2-3 nucleótidos de secuencia codificante corriente abajo (*primers* PsZF1 y PuZdegF11). Para el diseño de los *primers* se analizó y consideró la frecuencia del uso de codones en la secuencia conocida del gen. Se probaron diferentes combinaciones entre los cuatro *primers forward* (PsZF1, PsZF2, PuZdegF17 y PuZdegF11) y cuatro *primers reversos* diseñados en la zona de *puZ* conocida (puZ-qR11, puZ-qR12, puZ-qR17 y puZ-qR18). Para las diferentes combinaciones de *primers* se optimizaron las condiciones de amplificación incluyendo diferentes: polimerasas y buffers, concentraciones de molde,

Análisis de PuZ

temperatura de *annealing*, concentraciones de DMSO y MgCl₂, utilizando como molde tanto ADNg como ADNc.

Entre las combinaciones que mostraron una banda del tamaño esperado se seleccionó la amplificación de ADNg con los *primers* PsZF1 y puZ-qR18 por ser la que mostraba mayor especificidad. En estas condiciones se obtuvo un único producto de amplificación de aproximadamente 1700 pb que fue purificado y secuenciado con los mismos *primers* utilizados para su amplificación. A partir de la secuencia obtenida se diseñó un nuevo *primer* reverso en el extremo 5' dilucidado (puZseq-20) que fue utilizado para completar la secuencia del amplicón. El análisis de la secuencia consenso obtenida mostró que aproximadamente 400 pb solapaban con la secuencia conocida y en los 1300 pb restantes se dedujeron 255 pb de secuencia que codifican para 85 residuos amino-terminales y 1091 pb de secuencia no codificante distribuidos en 5 intrones (189 pb, 174pb, 57 pb, 222pb y 449 pb). La secuencia obtenida muestra una estructura génica compleja con numerosos intrones más extensos de los comúnmente observados en estos organismos (Figura 4-4). Este análisis sumado a la secuencia que ya conocíamos, completó la secuencia de una proteína, la cual comprende 583 residuos aminoacídicos.

Con la información obtenida se diseñaron los *primers* para el clonado total de la secuencia codificante usando como molde ADNc sintetizado partir de ARNm producido en condiciones de inducción. Debido a la metodología utilizada para dilucidación de la secuencia (*primer forward* diseñado en base a la secuencia de *P. strigosozonata*, sin ATG inicial ni los próximos 2-3 nucleótidos de secuencia codificante) se desconocía la identidad del segundo residuo aminoacídico y restaba confirmar los residuos correspondientes a la secuencia del *primer* PsZF1, ya que existía la posibilidad de que algunos nucleótidos fueran diferentes a los de *P. strigosozonata* en esta región y aún así el *primer* hibridara. Como *primer forward* para el clonado total se utilizó un *primer* de 23 pb (PuZcF2) cuya secuencia es la del *primer* PsZF1 con ATGGA en el extremo 5', de esta forma el producto clonado codificaría una versión de PuZ con la secuencia N-terminal MEPAITKL (igual que el transportador de *P. strigosozonata*, ver Figura 4-4).

Análisis de PuZ

M X P A I T K I 8
ATGXGCGGGGATACGAAACTCGATCGGCCCGCGGGCTCGCTGACCTCAGGGCGAAAAGGCTCTCTCTCTCCAGCTCCCGCTGGCTCTTGTTCGGACGAAGCGCAT
Ps2F1/PuZdegF11/PuZcF2

N D A 11
GAAACTGAAGGACGAGCGTCCCAAGGAGCGGGCGGGCTGACGAATCTATACCCTGACCCACCCACGCCCCAATAATACACCCCTAATTGGCAACGATCGCGGAGCG

V A S S F V G R W F K L D G S G I E R E 31
CTCGGTCTCTCCCAACGATGCTCATATAGTAGCTGGTGGTTCAGGTCGCGGACTCGGTATAGAACGGGAA
Ps2F2/PuZdegF17/PuZseq-R20

R E G S R F L 37
GTGAAGGCTCGATTCCTGGTGGTCTTTGGCATGTTCTATAGCTCGCTCGTGGCTCATGGCGCTATAAGCAGCGGAATTCGTGTGGAATCACGACATGGGCGGGTA

M A Y I 53
TGGCCTACATGTAGCTCCCTCACCTCGTCTCCCTAGCTCCAGCTGACATTTTACCGCGCTGGATGGTCTATCTCTTGGCAATTCGATCGTACCGCATGGCGCT
CATCCGTGTGTGCTGCTACCTCTCGTCCCGCTCCGCAACGCCACCTCCCAAGCCATAGCCCATATGCAAAACGACTCGCATAAACCCATATGCTGGTGTGCTGGCGCT
I A V N A S I L S G S G G T C V C T Q S D M C V H E D T Y L T C 85
CGAGATCGCGGTCAACGCCCTCGATCCTGCGGCTCGGGCGGAACATCGCTCGACCCAGAGCGCATGTGGCTCCATGAAGATACCTACCTGACCTGGCTGAGTCCCGCC
TCTCTCCCTTCTCTCTGATCTTGGTCTTCTCTGTTTATCGCTCTTCCCGCTGTCCCGCTTCCGGTCCCGGTCATGAATAAAATGGGACGACGCGGGTGC
CGCGGGTCATGCTGCGGTGACTGCCAAGACCGGGGACTGCACCCCGTCCCGTTTTCTCAITTCACAGCGGGGTGGCTCTCGGGCGACTCTGCCAAGACGTCGCT
CAGCGGTCCCGGATATGGTACTCGTCTGGCTCGGCTTCACTCGCTCGTGGCATCAAACCTGTCCCGAGATTTCGACCTCTTCTCTCGATCCCGGCTCTATCGAC
V E E V R 90
GCCTTCCACGACCTTCCCTTATCTGCTTAAAGTTAGATTCCGATGGCTCAAGTAATAAGTAATGATCGTGGCTTATCGCTTGGCTTATAGCTTGGAGTCCCG
PuZ-R11

Q D L I T T T A A V S A L A S C L M G L L A N L P I G L A P G L G L N A Y 128
CGAGATCTAATACGACCACCGCGCGGTGTCGGCAGTGGCGCTCGTGTGATGGCTTGTAGCCAACTCCCGACTCGGACTCGCGCCCGGTTGGGCTGAACCGCATAGCT
PuZ-R12

G A G T T G G T T T T T T T A C T T G G C C T C G G T C G A G G A C C A G G G C A T T G C T G C A A C T G C A C T C A G C T C G G G C G G T C G C T G G T A C A G C T C C A T C G A T T G C T G C G C
F T Y S I V G F H G S G Q I T Y Q E A L A A V F L E G 155
TAATCGACGATCTGATAGCTCAGCTATAGCATCGTGGTTCATGGCTCGGGCCAGATAACATATCAGGAAGCGCTCGCAGCCGTTTTCTCGAAGCGCAGCTTCTCTACTT

W V F V I L S L L G L R Q W L A R I M P Q S L V L A V 182
ACTGCTCGTCTATTTCTGACCCCATGAGCAGCTGGGTTCGFCATATGTCGCTGGTCTTCGACAAATGGTACGGCATATCATCCGCGACTCTTGGTATTTGGCGCT
PuZ-R18

G A G I G L F I A F I G L 195
TGGCGTGGCATCGCTGTATTATGCCCTTCATCGCCATGTGAGCAATTTGGTGACGCCATGTGGGGATATGGGTGCTGACTCCGTTTTCCCTCTCGCTTAGCAATGG
S N G 198

G L F V I G G D Q T N F V G L G G C K T E 219
CGGTCTTTTCTGATCGGTGGCGACGACGAATTCGTTGGCCTTGGAGGTGCAAAACGGAAGGTACCGCTGCCGTCTCTCGTATTTCCATCGGACTCTTTTAGGTGCGCC

D Q F A N L S G Y C E H G V L Q L P T M W L G I F C G G I L T L 251
ATTGACAACATATCAGATCAATTCGCGAACCTCTCGGCTATTGGGAGCATGGCGTCCAGCTTCCAACGATGTGGCTCGGCATCTTCTGCGCGGAATCTTGACATGTC
PuZ-R17

L L M L Y R V K G A I L I G I F L V S I I S W P R P T S V T A F P H T P T G 289
TCCATGCTCTACCGGTTAAAGGCGGATCCTCATCGGCATCTCTCGTCTCCATCATCTCTGGCCCCGTCGACGTCGCTTACCGCTTCCCGCATACGCCACCGGTG

D T A F E F E F K K V V T F R P L K R V G N V L D Y H Y G N G R V W Y A L V T 326
ACACCGCTTCGAGTTTCAAGAAGTTCGTACCTTCCCGCGTGAACCGCTCGGCAACGTCGCTGACTACCACACGCGGCGGCTTGGTACCGCTCGTCACTG

F L Y V D I L D T T G T L Y S M A K F A G L R D P V T L D F E R S T V A Y C 365
TCCCTACGTCGACATCCTCGACACGACGGGCACTCTACTCGATGGCCAAGTTTGGCGGCTTGGCGGACCCGGTCAGCTCCGATTCGAGAGGACCGGTCGCTACGTCG
PuZ-R16

V D A F S I S M G A L M G T S P V T A F I E S A T G I S 393
TCGACGCTTCGATCAGTATGGCGGCTGATGGGACCCAGCCCTCTGACCGCTTTCATCGAGCGCCACCCGCAATTCGCGTATGTCGCTGATCCGAGGGGAGGC
PuZ-R6

E G G R T G I T A I T T G L M F F V S V F F A P I F A 420
GTTTTGCTGACGGATGTTCTTGGCGAATAGAGGTGGACGGACAGGTATCACCAGCATCAGACGGGGCTCATGTTCTCTGTCAGCGTCTTCTCGCGCCATCTTCGCGT

S I P E W A T G S A L V I V G C L M I R N V K E I N W D Y V G D A I P A F L 458
CGATACCCCTTGGCGACCGGAATGCGCTCGTCATCGCTGGCTTGTGATGATCCGCAACGTCAGGAGATCAACTGAGGACTACGTCGTCGACGCGATACCCGCTCTGTA

T I I I I P L S Y N I A Y G I I A G L G S Y I A I N G P A W I L M K I S G G 496
CCATCATATATCCCTCTGCTACACATCGGTACGGCATCATCGCGGCTGGGCTCTACATAGCCATCAAGGCGCCGGCTTGGATCCTCATGAAGATTTCCGGCGGAC

R I I P A H Y E Y S E E W I V P P G G L V P I W F Q K L T G R Y Q D P H L D 534
GATATATCCCGCGGATTCGAATACGAAGAGTGGATCGTCCACCGGGCGCTTGTACCCATCTGGTTCAAAGCTCACGGGAGATATCAAGACCCACACTTGGACC

P P Q E L Q S R Q E H S I D M A E S A H G D A L R Q K F E D D V S V R S S G 572
CGCCGACGAGCTGCAGCGCACAGAACACTCGATCGATATGGCGAGCTCGCCACGGGACCGGCTCCGGCAGAGTTCCAGGACGACGCTTTCGGTCCGGTCCCGGAC
PuZcR1

Q H H *
AACATCATGACCAATTTTGGGCCACGCTCTTAACTCGCTTCTCTGCTTTTTTTCCCGCTGACTCTTCCCGCCCTTCCGCTTCTCACGCTCTCGCGCTTCTGTTGGCA
PuZcR2

Figura 4-4: Secuencia de puZ. La secuencia mostrada es el resultado de los datos obtenidos mediante amplificación con primers degenerados, RACE PCR y RNA-seq. En línea punteada se marca la secuencia previamente conocida y en línea continua la secuencia identificada en este trabajo. Los exones se marcan en negro y los intrones en gris, los motivos pie de intrón se indican en letra cursiva con sombreado gris. En la región 3' no se indican los intrones (ver Figura 4-2). La ubicación de los primers utilizados se marca en la secuencia con negrita-subrayado y con el nombre debajo. Por información de la secuencia de los primers dirigirse a Sección 6.4. Con X se marca el residuo y los nucleótidos desconocidos. Los números indican la numeración del residuo aminoácido que se encuentra a la izquierda. Las modificaciones aportadas por los datos transcriptómicos se marcan en sombreado gris. Para datos de la secuencia previa referirse a la Figura 4-2. Los residuos con identidad dudosa se marcaron sin negrita (ver texto para más detalles).

Análisis de PuZ

El *primer forward* PuZcF2 se utilizó en combinación con el *primer reverso* PuZcRc2 (Figura 4-4). Se probaron diferentes condiciones de amplificación incluyendo diferentes: polimerasas y buffers, concentraciones de molde, temperatura de *annealing*, concentraciones de DMSO y MgCl₂. En ningún caso se obtuvo una banda del tamaño esperado (1728pb) y se decidió verificar la secuencia obtenida de *puZ* mediante el análisis del transcriptoma de *P. atropurpurascens*. Las lecturas del RNA-seq fueron depuradas y ensamblados mediante la herramienta Trinity (Grabherr et al., 2011). Los datos aportados por este análisis permitieron verificar la secuencia codificante deducida. Se corrigieron las bases en todas las posiciones donde el 100% de las lecturas (reads-RNA-seq) fue diferente a la secuencia original. De esta forma se definió una nueva secuencia consenso que difirió de la original en 12 bases nucleotídicas: C29A, C30T, C31G, A32C, A413G, T684C, C1248G, T1251C, T1260G, C1263G, A1359G y la inserción de una A luego de G1690 (Figura 4-4). Estas sustituciones nucleotídicas implicaron sólo 3 cambios a nivel proteico: C29A y C30T provocaron el cambio del codón de GCC que codifica para alanina a GAT que codifica para aspartato (D10). Análogamente C31G y A32C introdujeron el cambio de glutamina a alanina (A11) ya que el codón cambió de CAG a GCG y A413G introdujo el cambio de aspartato (GAC) a glicina (GGC, G64). La inserción de adenina en la posición 1691 provocó un cambio en el marco de lectura, se modificó el codón de terminación predicho y los últimos 12 residuos se reasignaron a: D-D-V-S-V-R-S-S-G-Q-H-H (Figura 4-4 y Figura 4-2).

En la secuencia obtenida del análisis transcriptómico se encontraron 26 nucleótidos que diferían de la secuencia clonada en el 50% de las lecturas (*reads* de RNA-seq). Si bien esto es algo inherente a las técnicas de secuenciación masiva se analizaron los cambios que implicarían si fueran considerados. Se determinó que los 26 cambios nucleotídicos solo implicarían 4 cambios aminoacídicos: I28V, D64A, A150V y A557V que se encuentran en una región de la proteína de alta variabilidad y además el residuo que se traduce de la secuencia clonada es más frecuente (Figura 4-5).

Respecto al extremo 5' los datos transcriptómicos confirmaron la dificultad de amplificación que presentan esta zona del gen. La resolución obtenida en esta zona permitió obtener datos confiables a partir de la posición 22 y si bien la identidad de los 21 nucleótidos aportados por la secuencia del *primer* de amplificación (PsZF1) no pudo ser completamente verificada, las lecturas revelaron el cambio de C22 por A, cambiando el codón que codifica para el residuo 8 de: CTC (Leucina) a ATC (Isoleucina) (Figura 4-6).

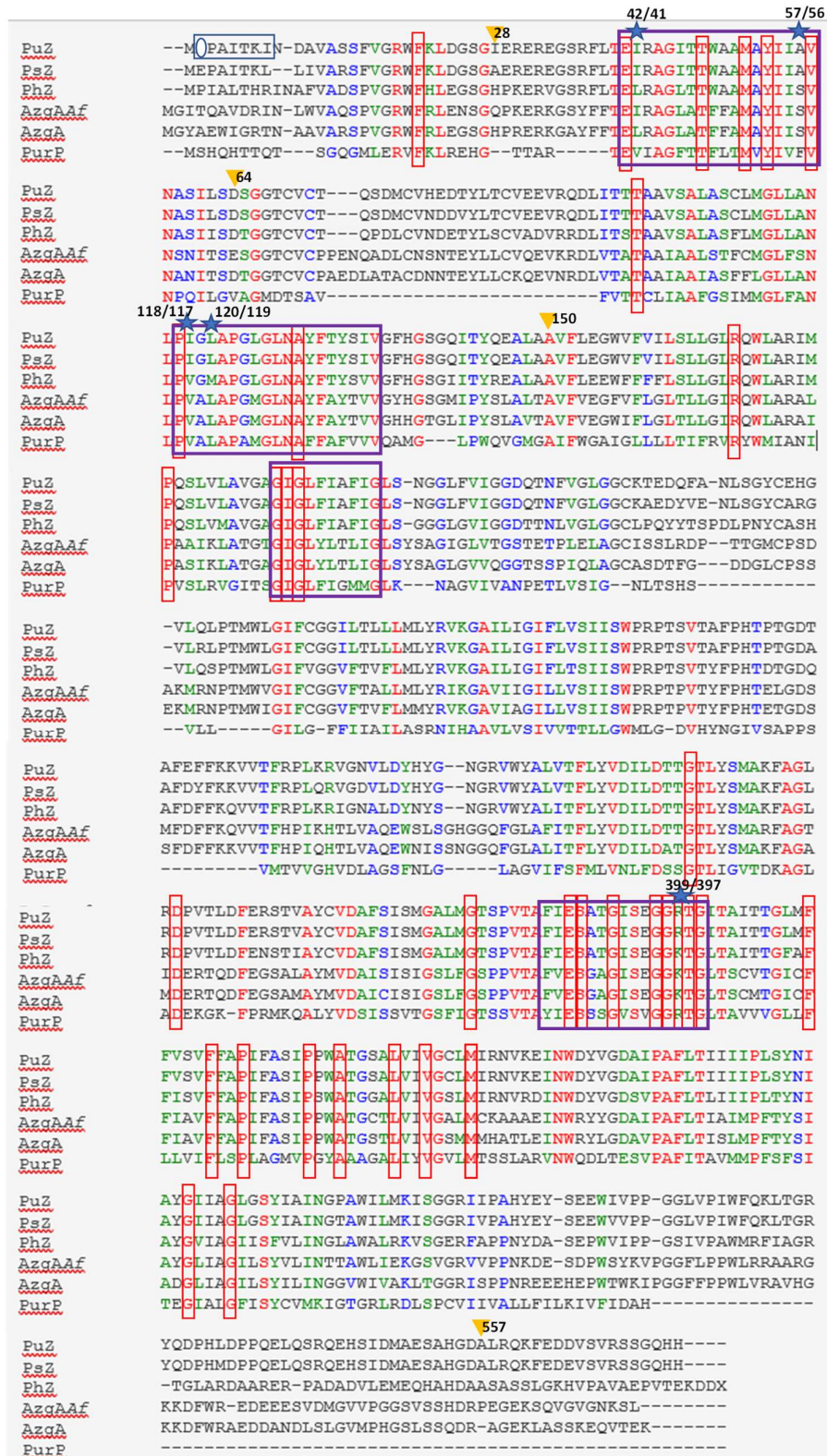


Figura 4-5: Alineamiento PuZ y otras proteínas AzgA-like. Alineamiento mediante ClustalW de los transportadores PuZ, PhZ, AzgA, AfAzgA, PurP y la proteína hipotética del Basidiomycota *P.strigosozonata* (PsZ). Los residuos invariantes de todas las AzgA-like se muestran en rojo y los motivos conservados se muestran recuadrados en azul. Con un círculo azul se marca la posición de residuo desconocido y con un rectángulo azul los 5 residuos que quedaron por confirmar. Con estrellas azules se

Análisis de PuZ

marcan los residuos de los motivos que son diferentes en PuZ y PhZ, indicándose la numeración PhZ/PuZ. En triángulos naranjas se marca la posición de los residuos que variarían si se tuvieran en cuenta los cambios que en el 50% de los *reads* de RNA-seq difirieron de la secuencia original.

En suma, mediante las distintas metodologías abordadas se confirmó una secuencia consenso que predice una proteína PuZ con 575 residuos aminoacídicos (Figura 4-4). En la secuencia se identificaron los 35 residuos invariantes y los cuatro motivos conservados que caracterizan la familia *AzgA-like*. PuZ presenta alta homología de secuencia con PhZ (89% similitud y 75% de identidad). A nivel de los motivos característicos de la familia *AzgA*, sólo presentan 5 diferencias. Dos en el motivo 1: L42 de PhZ que es I en PuZ (41) y S57 que es A (56); dos en el motivo 2: V118 de PhZ que es I (117) y M120 que es L (119); y una en el motivo 4: K399 de PhZ que es R (397). Respecto a la proteína hipotética deducida del genoma de *P. strigozonata* se puede decir que ambos transportadores son casi idénticos (98,6% similitud y 95,6% de identidad).

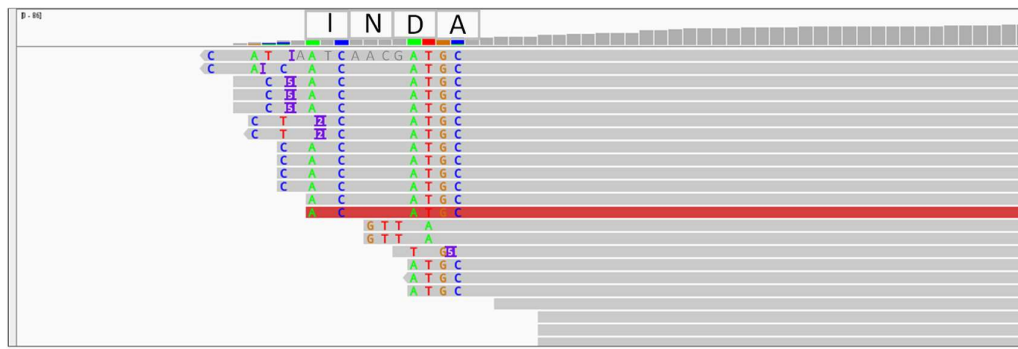


Figura 4-6: Análisis del extremo 5' de *puZ*. Se muestra una captura del análisis de RNA-seq obtenido mediante el programa Trinity. En gris se indican las similitudes que los transcritos tienen con la secuencia *query* y en colores las diferencias. En el extremo superior de la figura se marcan con recuadros grises los 4 codones que codifican para los residuos I8, N9, D10 y A11. El cambio de C22 a A22 fue considerado en la secuencia que se muestra en la Figura 4-4 a pesar de que el número de lecturas en esta zona fue bajo (13 *reads*) porque se corresponde con la secuencia aportada por el *primer* de amplificación (PsZF1).

La estructura de la proteína PuZ se analizó mediante el servidor MemBrain (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/>) desarrollado especialmente para la predicción de estructuras de proteínas de membrana (Yin et al., 2018). La estructura predicha consiste en 13 STM, y una localización citoplasmática tanto para el extremo amino como para el carboxilo terminal (Figura 4-7 A). La estructura que predice MemBrain para PhZ es muy similar, las únicas diferencias se encuentran en: el STM 12 que en PuZ es una hélice media, que los STM 10 y 11 en PhZ serían *back to back* (estarían

Análisis de PuZ

conectados por un *loop* corto de no más de 3 residuos lo que provocaría que estén muy próximos), y que el extremo carboxilo terminal en PhZ estaría orientado hacia el medio extracelular (Figura 4-7 A y B).

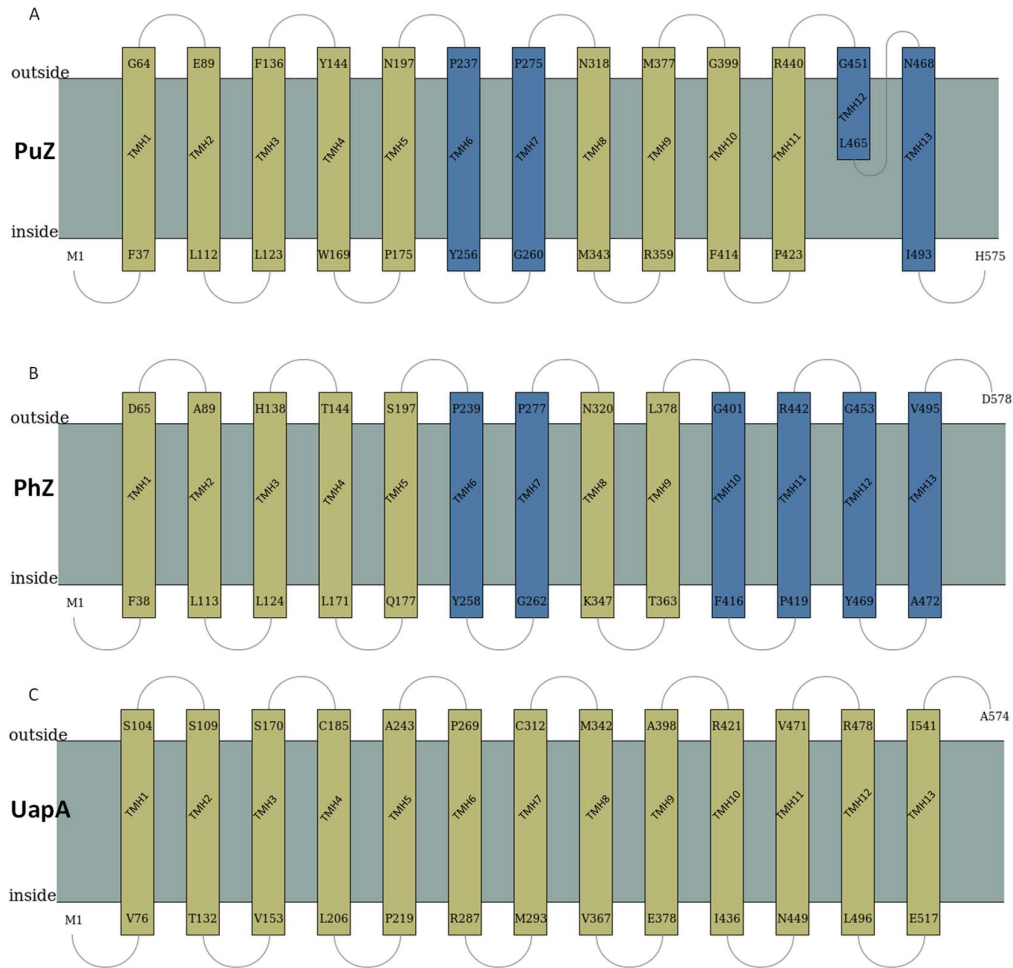


Figura 4-7 : Estructura PuZ. Se muestra la estructura predicha mediante MemBrain (Yin et al., 2018) para PuZ (A), PhZ de *P. chrysosporium* y UapA de *A. nidulans*. TMH indica hélice transmembrana (o STM), en azul se marcan las TMH *back to back*.

4.3.2 Construcción de *A. nidulans::puZ*

Con el objetivo de expresar PuZ en el mismo contexto genético que PhZ se utilizó el sistema de trabajo descrito en los capítulos anteriores: transformación de una cepa receptora de *A. nidulans* carente de transportadores de purinas (ΔZAC) con un *cassette* que dirigiera la integración de *puZ* al locus del gen *azgA*. El *cassette* 5'UTR_*azgA*-*puZ*-*gfp-riboB*-3'UTR_*azgA* se construyó mediante 3 PCR independientes y una PCR de fusión (Fusion-PCR). En este caso dada las dificultades encontradas en la amplificación del extremo 5'*puZ*, los 1725 pb de secuencia codificante (Figura 4-4) se sintetizaron en la empresa *Macrogen* junto a 36 pb que se corresponden con los últimos nucleótidos del 5'UTR de *azgA* y se diseñaron *primers* para amplificar la totalidad del fragmento. Paralelamente se amplificó el extremo 5'UTR *azgA* usando un *primer* reverso sin nucleótidos adicionales (5AZR1, Figura 4-8) ya que el final de este amplicón complementa con el inicio del amplicón anterior. La secuencia *gfp-riboB*-3'UTR_*azgA* se amplificó al igual que en el capítulo 2 usando un *primer forward* que incluye 20 nucleótidos adicionales que complementan con el extremo 3' de la secuencia codificante del transportador (sin incluir el codón de terminación). De esta forma se generaron amplicones 5' y 3' que solapan en 20-36 nucleótidos con el amplicón que contiene el ADNc y por tanto los tres fragmentos actúan tanto de ADN molde como de *primers* en la Fusion-PCR (con los *primers* P2AN5ZF2 y P5AN3ZR2). El resultado es única molécula integrada: 5'UTR_*azgA*-*puZ*-*gfp-riboB*-3'UTR_*azgA* (6475 pb) (Figura 4-8).

El *cassette* sintetizado fue purificado y utilizado para transformar la cepa de *A. nidulans* $\Delta ZAC::pyrG \Delta nku::argB riboB2 pyroA4 pabaA1$. Los transformantes se seleccionaron en medio carente de riboflavina, en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y amonio (este último como fuente de nitrógeno). Posteriormente, la cepa transformante seleccionada fue purificada y se verificó que la incorporación del *cassette* complementara el requerimiento por riboflavina pero no por ácido p-aminobenzoico ni piridoxina.

Análisis de PuZ

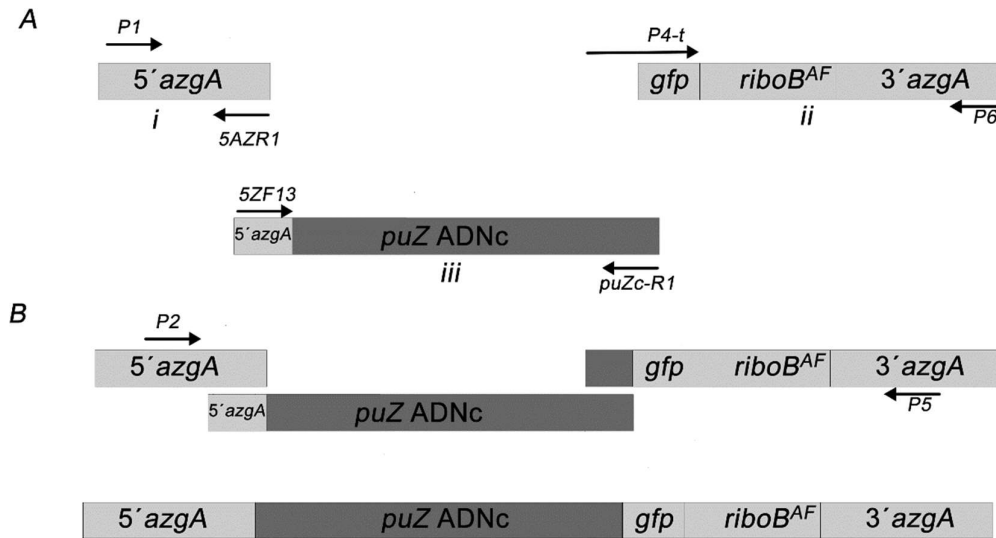


Figura 4-8: Esquema de la construcción del cassette 5'UTR_*azgA*-*puZ*-*gfp*-*riboB*-3'UTR_*azgA*. A) Se muestran los 3 fragmentos amplificados independientemente que fueron utilizados como molde para la PCR de fusión que se esquematiza en B. Ai) región 5'UTR del gen *azgA* (850pb) amplificada con los primers P1AN5Z-R1(P1 en figura) y 5ZF13. Aii) secuencia codificante de *puZ* (sin codón de *stop*) fusionada a 36 pb del 5' UTR *azgA* (1761 pb) amplificada con los primers 5ZZF13 y puZc-R1, Aiii) región 3'UTR del gen *azgA*, *riboB* y *gfp* (3900pb) amplificada con los primers P4-*gfp*-*puZ* (P4-t en figura) y P6AN3ZR1. B) Esquema de los moldes utilizados con los primers P2AN5ZF2 y P5AN3ZR2 en la PCR de Fusión para obtener el producto 5'UTR_*azgA*-*puZ*-*gfp*-*riboB*-3'UTR_*azgA*. Para más detalles ver Sección 6.5.18.

El análisis de crecimiento en distintas purinas y análogos tóxicos de las mismas (Figura 4-9), mostró que la cepa que expresa PuZ tiene un comportamiento similar a la cepa receptora (Δ ZAC): no puede crecer utilizando purinas como fuente de nitrógeno y crece en presencia tanto de análogo tóxico 8-azaguanina como de oxipurinol. Los ensayos de localización subcelular por microscopía de fluorescencia mostraron que el transportador no alcanza la membrana plasmática, sino que la fluorescencia se ve asociada a vacuolas y anillos citoplasmáticos (probablemente perinucleares) que se corresponderían con el RE. El gen *puZ* del transformante evaluado fue amplificado y se verificó la secuencia del *cassette* incorporado.

Análisis de PuZ

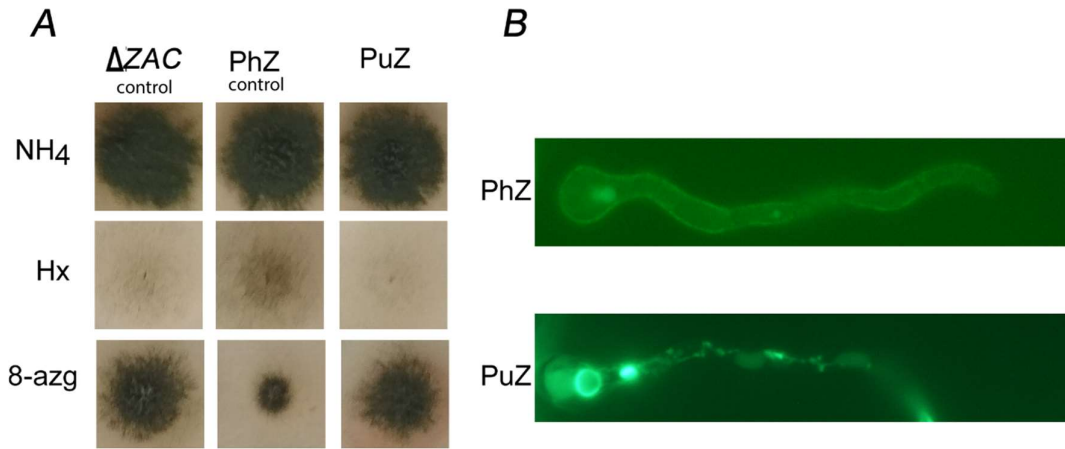


Figura 4-9: Evaluación de cepa *A. nidulans::puZ*. A) Análisis de crecimiento en placa: Las cepas de *A. nidulans* se crecieron por 48 hs a 37°C en distintas fuentes de nitrógeno: amonio (NH₄), ácido úrico (AU), hipoxantina (Hx), y análogos de purinas tóxicos: OxIpurinol + nitrato (Oxy) y 8-azaguanina + amonio (0,8 mM) (8-azg). Todas las condiciones se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. ΔZAC : $\Delta ZAC::pyrG \Delta nku::argB riboB2 pyroA4 pabaA1$ (control) y PhZ: $\Delta ZAC::phz::gfp::riboB$ (control). B) Localización subcelular *in vivo* de *A. nidulans::puZ* (PuZ) por microscopía de epifluorescencia. Como control se incluyó la cepa $\Delta ZAC::phZ$ (PhZ) que expresa el transportador PhZ fusionado a la proteína verde fluorescente. En el control se observa fluorescencia en membrana, vacuolas y anillos citoplásmaticos (ver Figura 1-16). Se analizaron 10-15 campos, para todos los casos se observó un mismo comportamiento, seleccionando por lo tanto una imagen representativa

4.4 Discusión y Perspectivas

Debido a que el genoma del Basidiomycota *P. atropurpurascens* no se encuentra secuenciado, el gen homólogo a *phZ* de *P. chrysosporium* fue clonado mediante la amplificación con *primers* degenerados, RACE PCR y datos transcriptómicos. Se obtuvo una secuencia del gen (*puZ*), a partir de la cual se deduce una secuencia aminoacídica de 575 residuos. El desafío que implica la amplificación del extremo 5' de estos genes determinó que la identidad de los primeros 5 residuos posteriores a la metionina inicial fuera asignada en base a la secuencia de *P. strigosozonata* (metodología utilizada para amplificación de extremo 5'). Dado el grado de similitud encontrado entre los transportadores de ambos basidiomicetes (98,6% similitud y 95,6% de identidad) y teniendo en cuenta que el *primer* PsZF1 (*P. strigosozonata*) hibridó con el ADN genómico de *P. atropurpurascens* es esperable que si existen diferencias estas sean mínimas. Además, dado que observando otras proteínas *AzgA-like* se puede ver que estos residuos se encuentran en una zona de gran variabilidad, la posibilidad de que la secuencia codificante analizada se diferencie de la original en 5 residuos no parece ser relevante. En la secuencia de PuZ deducida se identificaron los 35 residuos invariantes y los cuatro motivos conservados que caracterizan la familia *AzgA-like*. La proteína PuZ presenta alta

similitud con PhZ (89% similitud y 71% de identidad), pero cuando fue puesta en el mismo contexto genético que esta última, el transportador se localiza en vacuolas y lo que parece ser el RE (lo que indicaría un defecto en el plegamiento del transportador). Esto coincide con el hecho de que la cepa de *A. nidulans* que expresa PuZ es incapaz de crecer utilizando purinas, ya que el transportador no alcanza la membrana plasmática. Si bien este es un resultado posible, tomando en cuenta que se trata de una expresión heteróloga, dada la similitud que presentan ambas proteínas no era un resultado esperado. Una posible explicación puede ser la frecuencia de uso de codones y el rol que estos tienen en el plegamiento (Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Y. Liu, 2020) y que *P. chrysosporium* tenga una frecuencia de uso de codones más similar a lo de *A. nidulans* que *P. atropurpurascens*. Este resultado imposibilitó perseguir el último objetivo de este capítulo que era comparar el perfil de sustratos transportados por ambas proteínas e identificar posibles residuos críticos para seleccionar nuevas mutaciones a introducir en PhZ.

Respecto a la estructura, considerando la similitud de secuencias de PuZ y PhZ y los resultados obtenidos mediante MemBrain es posible suponer que el transportador de *P. atropurpurascens* se ajuste al modelo tridimensional de PhZ (construido en base al cristal de UapA). Según este modelo, el transportador está formado por 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas y un motivo β antiparalelo formado por una hoja β próxima al STM3 y otra próxima al STM10. Si bien MemBrain no predice el STM10 continuo a la hoja β que forma el motivo beta antiparalelo, esto mismo ocurre con UapA (Figura 4-7 C). Si bien los resultados muestran que el alcance de este tipo de programas es limitado (la estructura predicha para UapA y PhZ es diferente a la proteína cristalizada y al modelo tridimensional) nos permiten suponer que el transportador PuZ al igual que PhZ estaría formado por 14 STM y las principales diferencias entre ambos transportadores se encontrarían en el dominio carboxilo terminal. Para confirmar esta hipótesis se propone realizar un modelo tridimensional por homología utilizando la proteína UapA como molde.

4.4.1 Análisis *in silico* de posibles proteínas de la ruta catabólica de las purinas y proteína reguladoras

Si bien en principio no formaba parte de los objetivos de esta tesis, los datos obtenidos del análisis transcriptómico se utilizaron para identificar posibles proteínas de la vía catabólica de las purinas en *P. atropurpurascens*. Se identificaron transcritos que presentan similitud significativa con las correspondientes enzimas de *A. nidulans*: purina hidroxilasa I (*hxA*), xantina dioxigenasa (*xanA*), urato oxidasa (*uaZ*) y urea amido hidrolasa (*ureB*) (Gournas et al., 2011) (Ver Figura 1-8) . No se encontró ninguna secuencia con similitud significativa a adenina desaminasa (*nadA*), alantoína amidohidrolasa (*alx*) ni a alantoato amidohidrolasa (*aaX*). En el genoma de *P. chrysosporium* y *P. strigosozonata* sí se encuentran secuencias con homología a estas enzimas (Barraco-Vega, 2014) por lo que el resultado obtenido puede deberse a que en la condiciones del ensayo tengan baja expresión y por eso no pudieron ser detectadas. Otra posibilidad es que *P. atropurpurascens* utilice vías alternativas para oxidar la adenina a hipoxantina y la alantoína a urea. Tampoco se encontraron secuencias con similitud a la purina hidroxilasa II (*hxnS*), esto indicaría que la oxidación de hipoxantina a xantina se podría dar mediante la ruta que implica la utilización de la purina hidroxilasa I (*hxA*). Este fue un resultado que llamo la atención ya que en los genomas de *P. chrysosporium* y *P. strigosozonata* no se encontraron secuencias con homología a ninguna de las purinas hidroxilasas. Esto podría deberse a alguna limitante impuesta por las herramientas de búsqueda o podría estar indicando que *P. atropurpurascens* utiliza diferentes mecanismos para catabolizar las purinas. Podría ser que, mientras adenina e hipoxantina se metabolizan por vías alternativas en *P. chrysosporium*, en *P. atropurpurascens* la oxidación de hipoxantina a xantina sea a través de la enzima homóloga a la purina hidroxilasa I de *A. nidulans* (*hxA*). La ausencia de la enzima tipo purina hidroxilasa II en ambos basidiomicetes podría explicar porque adenina e hipoxantina son fuentes de nitrógeno más pobres que xantina o ácido úrico. La presencia de la enzima tipo purina hidroxilasa I (*hxA*) en *P. atropurpurascens* podría explicar porque este hongo presenta diferentes niveles de crecimiento en adenina e hipoxantina que *P. chrysosporium*. Estudiando la expresión de estos genes en diferentes purinas se podrá obtener información interesante respecto al metabolismo de las purinas de estos hongos Basidiomycotas.

Análisis de PuZ

Respecto a la expresión del gen *puZ*, en trabajos anteriores determinamos que ninguna purina parece inducir el gen (alterna entre un estado reprimido y un estado desreprimido en ausencia de fuente de nitrógeno) (Barraco-Vega, 2014). Utilizando los datos del RNA-seq de *P. atropurpurascens* se identificaron transcritos que podrían codificar proteínas reguladoras del tipo de AreA y UaY (*A. nidulans*, ver Introducción general). Se obtuvieron transcritos que presentan similitud significativa con AreA (consenso 87% de cobertura, 65,6 % de identidad promedio) a partir de los cuales se identifica el dominio que se corresponde con la región esencial del dedo de zinc (83% de identidad respecto al dominio de AreA). También se obtuvo un transcripto que presentan similitud significativa con UaY (95,7% de identidad) y en el mismo se identifica el dominio *cluster* de zinc. Dado que en cierta medida estos resultados no acompañan los resultados de expresión pensamos que la inducción por purinas podría no haber sido detectada ya que el gen *gpd* (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) que fue utilizado como referencia en los estudios de expresión puede no ser constitutivo en *P. atropurpurascens*. En base a los datos del transcriptoma se seleccionaron genes constitutivos candidatos para realizar la validación de genes de referencia (RT-qPCR) y con estos resultados podremos reevaluar la expresión del gen *puZ*. Además, analizando el genoma (recientemente secuenciado por nuestro grupo de trabajo) se podrán indagar las secuencias promotoras del gen *puZ* e identificar motivos WGATAR que podrían ser sitios de unión de proteínas como AreA, y secuencias con los repetidos CGG invertidos, directos o divergentes posibles blanco de acción de proteínas de la familia de reguladores con *cluster* binuclear de zinc (Cecchetto et al., 2012).

Por último, con la información obtenida del análisis transcriptómico se determinó que *P. atropurpurascens* también tiene un transportador de purinas tipo NAT homólogo a PhU de *P. chryso sporium* (91% similitud y 77% identidad), el cuál sería interesante de analizar.

4.5 Conclusiones

Se obtuvo la secuencia génica a partir de la cual se deduce que el transportador PuZ de *P. atropurpurascens* tiene una secuencia aminoacídica de 575 residuos donde se identifican los 35 residuos invariantes y los cuatro motivos conservados que caracterizan la familia *AzgA-like*.

La proteína PuZ presenta alta similitud con PhZ y a nivel estructural las principales diferencias se encontrarían en el dominio carboxilo terminal.

En el transcriptoma de *P. atropurpurascens* se identificaron transcritos que podrían codificar proteínas reguladoras del tipo de AreA y UaY y diferencias con *P. chrysosporium* respecto a la vía catabólica de las purinas que podrían explicar la diferencia de crecimiento que ambos hongos tienen en adenina e hipoxantina.

Los resultados obtenidos en este capítulo con el transportador de purinas PuZ del Basidiomycota *P. atropurpurascens* son un aporte al conocimiento de las proteínas de la familia *AzgA-like*.

5 Conclusión general

Conclusión general

El presente trabajo contribuye al conocimiento de los determinantes estructurales de la función de proteínas fúngicas transportadoras de purinas, especialmente de las proteínas de la familia AzgA-like que son las menos estudiadas. Utilizar como modelo los transportadores de *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens* (grupo filogenético más distante y hasta ahora inexplorado) también permitió avanzar en el conocimiento del sistema de captación de purinas de estos Basidiomycotas degradadores de madera. Esto constituye un aporte hacia el entendimiento de los mecanismos de respuesta a las limitaciones de nitrógeno en estos hongos de importancia biotecnológica.

P. chrysosporium y *P. atropurpurascens* pueden utilizar purinas como fuente de nitrógeno. En este trabajo determinamos que ambos tienen un transportador perteneciente a la familia AzgA-like y otro perteneciente a la familia NAT. Haciendo énfasis en las proteínas AzgA-like se analizó el transportador de *P. atropurpurascens* (PuZ) y se determinó que presenta alta similitud de secuencia con el de *P. chrysosporium* (PhZ).

Respecto a los transportadores de *P. chrysosporium* se determinó que la estructura tridimensional de ambos (PhZ tipo AzgA-like y PhU tipo NAT) consiste en 14 segmentos transmembrana, tres hélices internas y un motivo β antiparalelo formado por hojas β próximas al STM3 y STM10 que se agrupan espacialmente en dos dominios: uno más compacto que incluye los STM 1-4 y STM 8-11 (dominio núcleo) y otro más flexible que incluye los STM 5-7 y STM12-14 (dominio entrada). Esta estructura es muy similar a la que está planteada para los homólogos de *A. nidulans* AzgA y UapA si bien este trabajo propone que las permeasas de *P. chrysosporium* tienen diferencias en los procesos de transporte y reconocimiento de sustratos que las de *A. nidulans*. Con el modelo de PhU se analizaron ocho residuos que presentan diferencias con los residuos reportados como críticos en UapA. Entre estos S421, I422, V157 y T159 están ubicados en el motivo β antiparalelo, los dos primeros formarían interacciones necesarias para el mantenimiento de la arquitectura del sitio de unión y el último interaccionaría con el sustrato mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Con respecto a los otros cuatro residuos analizados: A120 (STM2), S458 (STM11-STM12), R486 (STM12) y P546 (STM14), éstos se encuentran alejados del sitio de unión al sustrato propuesto, y mediante el análisis de los mutantes A120Q y P546G determinamos que A120 tiene un rol relacionado al reconocimiento de sustratos y P546 es clave para el mantenimiento de la arquitectura del transportador PhU.

Conclusión general

Respecto a la relación estructura-función de PhZ, mediante *docking* molecular y análisis mutacional se identificaron varios residuos críticos para la unión y el transporte del sustrato. Entre estos se propone que L124 (STM3), D337 (STM8), I388 (STM10), E389 (STM10) y R442 (STM12) interaccionarían con el sustrato mediante la formación de enlaces de hidrógeno con el anillo pirimidínico e imidazol. Mediante la evidencia experimental se demostró que Y54 (STM1), A128 (STM3), Y129 (STM3) y A148 (STM4) son importantes para el mantenimiento de la arquitectura de PhZ y que residuos que no forman parte del sitio principal de unión al sustrato son claves para la actividad de transporte de PhZ. Sustituciones en V58 (STM1), S133 (STM3), T392 (STM10) y A418 (hélice interna entre STM11-STM12) provocan disminución o aumento de la captación de hipoxantina sin modificar la afinidad de unión por esta purina. Es importante destacar que este es el primer trabajo que identifica residuos críticos para el transporte en el STM12 y hélice interna entre STM11-STM12 en una proteína *AzgA-like*.

De acuerdo con la idea de que las proteínas *AzgA-like* forman un grupo funcional y evolutivamente distinto al de los transportadores NAT, todos los residuos que mediante el análisis mutacional fueron determinados como funcionalmente críticos para PhZ tienen alto grado de conservación en la familia *AzgA-like*, pero ninguno se conserva en la familia NAT. Esto lleva a pensar que, aunque las proteínas *AzgA-like* y NAT parecen compartir una ascendencia molecular común, que se refleja en la similar topología de su estructura (general y local), también parecen haber divergido significativamente con respecto a sus especificidades empleando diferentes residuos para unir y transportar sus sustratos.

6 Materiales y Métodos

6.1 Cepas

Escherichia coli: genotipo TOP10 [F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*]

Phanerochaete chrysosporium: 1556, DZM

Punctularia atropurpurascens: H2126

Aspergillus nidulans (son todas *veA1*):

A excepción de la cepa silvestre todas las cepas fueron construidas en (Barraco-Vega, 2014).

Wt: *pabaA1*

Δ ZAC: Δ *azgA* Δ *uapA* Δ *uapC*::*pyrG*^{AF} Δ *nkuA*::*argB pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG* (*argB*?)

PhZ(wt): Δ *azgA*::*phZ*::*gfp*::*riboB* Δ *uapA* Δ *uapC*::*pyrG*^{AF} Δ *nkuA*::*argB pabaA1 riboB2 pyroA4* (*pyrG*?) (*argB*?)

PhU(wt): Δ *azgA*::*phU*::*gfp*::*riboB* Δ *uapA* Δ *uapC*::*pyrG*^{AF} Δ *nkuA*::*argB pabaA1 riboB2 pyroA4* (*pyrG*?) (*argB*?)

AzgA: *azgA*::*gfp*::*riboB* Δ *uapA* Δ *uapC*::*pyrG*^{AF} Δ *nkuA*::*argB pabaA1 riboB2 pyroA4* (*pyrG*?) (*argB*?)

UapA: Δ *azgA* Δ *uapA*::*uapA*::*pabaA* Δ *uapC*::*pyrG*^{AF} *pabaA1 riboB2*

Descripción de los genotipos

- *pabaA1*: mutación en el gen *pabaA* que codifica la sintasa del ácido paraaminobenzoico, genera auxotrofia por el mismo.
- *pyroA4*: mutación del gen *pyrA* que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de piridoxina (vitamina B6), genera auxotrofia por la piridoxina.
- *riboB2*: mutación en el gen *riboB*, que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de riboflavina (vitamina B2), genera auxotrofia por la riboflavina.
- *pyrG89*: mutación en el gen *pyrG*, que codifica la orotidina 5'-fosfato carboxilasa, genera auxotrofia por la uridina y el uracilo.

- *argB2*: mutación en el gen *argB* que codifica la ornitina carbamil transferasa la cual cataliza la conversión de ornitina en citrulina, un precursor de arginina, genera auxotrofia por la arginina.
- *veA1*: mutación en el gen *veA* que codifica una proteína involucrada en el control de la diferenciación provocando una conidiación más profusa y por lo tanto una mayor facilidad de réplicas.
- $\Delta azgA$: deleción en el gen *azgA* que codifica el transportador AzgA, genera deficiencia en el crecimiento en hipoxantina como única fuente de nitrógeno y resistencia a la 8-azaguanina.
- $\Delta uapA$: deleción en el gen *uapA* que codifica el transportador UapA, genera deficiencia en el crecimiento en ácido úrico y xantina como única fuente de nitrógeno y resistencia al oxypurinol.
- $\Delta uapC::pyrG^{AF}$: gen *uapC* que codifica el transportador UapC interrumpido por el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*.
- $\Delta nkuA::argB$: gen *nkuA* interrumpido por el gen *argB*. El gen *nku* codifica la subunidad 1 de la helicasa II, implicada en procesos de recombinación heteróloga, la deleción de este gen reduce considerablemente la frecuencia de integración de las secuencias foráneas en otros lugares del genoma y por tanto favorece la recombinación homóloga (Nayak *et al.*, 2006).
- $\Delta azgA::phU::gfp::riboB$: es el gen *phU* que codifica el transportador PhU de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $\Delta azgA::phZ::gfp::riboB$: es el gen *phZ* que codifica el transportador PhZ de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $azgA::gfp::riboB$: gen *azgA* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*.

6.2 Medios de cultivo

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

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

Esterilización por filtración: filtro de 0,25 μm .

6.2.1 *Aspergillus nidulans*

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

Solución de sales:

26 g de cloruro de potasio

26 g de sulfato de magnesio heptahidratado

76 g fosfato de potasio monobásico

50 ml de solución de elementos traza

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo y luego se le agrega 2 ml de cloroformo como conservante. Se almacena a 4°C.

Solución de elementos traza:

40 mg borato de sodio decahidratado

400 mg sulfato de cobre pentahidratado

800 mg fosfato férrico dihidratado

800 mg sulfato de manganeso dihidratado

800 mg molibdato de sodio dihidratado

8 g sulfato de zinc heptahidratado

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo y se conserva a 4 °C.

Solución de casaminoácidos:

150 g caseína hidrolizada

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo y se conserva a 4 °C.

Solución de vitaminas:

50 mg de tiamina-HCl

10 mg de biotina

100 mg ácido nicotínico

200 mg pantotenato de calcio

50 mg piridoxina-HCl

Materiales y Métodos

100 mg riboflavina

500 mg ácido p-aminobenzóico

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4 °C.

Medio mínimo sin nitrógeno (MM):

20 ml de solución de sales

10 g de glucosa

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo.

Observación: debe complementarse con una fuente de nitrógeno y con los suplementos nutricionales requeridos según las auxotrofías de la cepa cultivada.

Medio mínimo sin nitrógeno y sin fosfato (MM-P):

Igual que MM pero la solución de sales y elementos traza se prepara sin fosfato.

Medio completo (MC):

20 ml de solución de sales

10 ml de solución de vitaminas

10 ml de solución de casaminoácidos

10 g de glucosa (dextrosa)

2 g peptona

1 g de extracto de levadura

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

Observación: para cepas auxótrofas para arginina, o uracilo y uridina, es necesario agregar estos suplementos al medio completo.

Medio para la regeneración de protoplastos (isosmótico):

20 ml solución de sales

10 g de glucosa

342.3 g de sacarosa

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo.

Materiales y Métodos

Observación: debe complementarse con una fuente de nitrógeno y con los suplementos nutricionales requeridos según las auxotrofías de la cepa cultivada.

Suplementos para *A. nidulans*:

Se esterilizan mediante calor húmedo y se conservan a 4°C salvo que se especifique lo contrario.

Fuente de nitrógeno:

- Purinas y análogos de purinas: se agregan directamente al medio antes de usar (0.1 mg/ml).
- Urea: 3.03 g en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza mediante filtración. Uso 1:100.
- Tartrato de amonio: 92 g en 1 L de agua destilada. Uso 1:100.
- Nitrato de sodio: 81 g en 100 ml de agua destilada. Uso: 1:100.
- Ácido 6-hidroxinicotínico: 13.9 g en 100 ml de agua destilada alcalinizada. Uso: 1:100.

Suplementos auxotróficos

- Ác. p-aminobenzoico: 20 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Pantotenato de calcio: 20 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Piridoxina HCl: 500 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- L-arginina: 526 mg en 10 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Biotina: 10 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Riboflavina: 25 mg en 100 ml de agua destilada. Se almacena en oscuridad. Uso 1:100. Se esteriliza por filtración.

Análogos de purinas tóxicos

- Oxipurinol: 0.152g en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100 Observación: se utiliza con nitrato como fuente de nitrógeno.
- 8- azaguanina: 1g en 100 ml de agua destilada alcalinizada con NaOH. Uso 1:100 Observación: se utiliza con amonio como fuente de nitrógeno (0,8 mM).

6.2.1.1 *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens*

Extracto de Malta:

20 g de extracto de malta en 1000 ml de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

6.2.2 *Escherichia coli*

Medio Luria-Bertani (LB):

10 g bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 7. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Ampicilina: 50 µg/ml (Stock = 100 mg/ml).

Para selección blanco-azul (por placa): 40 µL X-gal (2%) y 4 µL de IPTG (20%).

Medio Luria-Bertani (LB) para células competentes:

10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Se lleva a 950 ml con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 1 L con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Medio SOB:

20 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl. Se lleva 950 ml con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 1 L con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Medio SOC:

A 10 ml de SOB esterilizado y enfriado a menos de 60°C se le agregan 50 µL de MgCl₂ (2M) y 200 µL glucosa (1M).

6.3 Plásmidos

Tabla 6-1: Plásmidos utilizados en esta tesis

Nombre	Tamaño (pb)	Descripción	Origen
pGemT Easy	3015	Vector T	Promega
pMB01	4800	pGemT:: <i>phUc</i>	(Barraco-Vega, 2014)
pMB02	4752	pGemT:: <i>phZc</i>	(Barraco-Vega, 2014)
pMB03	5030	pGemT:: <i>azgA</i>	(Barraco-Vega, 2014)
pPuZ	4792	pGemT:: <i>puZ</i> ::5'UTR <i>azgA</i>	Esta tesis
p5' <i>azgA</i>	3865	pGemT:: 5'UTR <i>azgA</i>	(Barraco-Vega, 2014)
p3' <i>azgA</i>	7826	pHL82:: 3'UTR <i>azgA</i>	(Barraco-Vega, 2014)

6.4 Primers

Tabla 6-2: Primers utilizados. La secuencia se representa de 5' a 3'. Todos los primers fueron diseñados en esta tesis y en (Barraco-Vega, 2014) a excepción de los marcados con *: *1(Ibáñez, 2010), *2(Barraco Vega, 2010) y *3 (Dourron, 2017). Todos los primers para mutagénesis fueron diseñados teniendo en cuenta el uso de codones de *A. nidulans* (Iriarte et al., 2012), en su secuencia con letra minúscula se indica el cambio introducido. Todos fueron sintetizados por MacroGen Korea. Para ver ubicación de primers en secuencia *phZ*, *phU* y *puZ* dirigirse Figura 6-1 y Figura 4-4.

Nombre	Secuencia	Uso
PhZ-cF1	ATGCCTATCGCCCTCAC	Gen <i>phZ</i>
PhZ-cR1	TCAGTCGTCCTTCTCGGTGAC	
PhU-cF2	ATGTCTGACCACTCGATTGTGA	Gen <i>phU</i>
PhU-cR2	TCAATCCCTGTCCTTCTCTTTC	

Materiales y Métodos

P1AN5ZF1	TGTAGACCATTCTGATTGATTGAA	Fusion-PCR
AN5ZR1/5AZR1	GCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	Fusion-PCR
P2AN5ZF2	GTGAGTTTGCCTAGCAATG	Fusion-PCR
AN3ZF	CCAACGTGACCGGTATAGTATAGA	Fusion-PCR
P6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG	Fusion-PCR
P3-phZ	GTGAGGGCGATAGGCATGCTGTCTGTGAGGTCAAAT AGG	Fusion-PCR <i>phZ</i>
P3-phU	TCACAATCGAGTGGTCAGACATGCTGTCTGTGAGGT CAAATAGG	Fusion-PCR <i>phU</i>
P5AN3ZR2	ATGGTTTGGCATTCTCTTGG	Fusion-PCR
P4GFPphZ1	GGTCACCGAGAAGGACGACGGAGCTGGTGCAGGCG	Fusion-PCR <i>phZ</i>
P4GFPphU1	TGAGAAAGAGAAGGACAGGGATGGAGCTGGTGCAG GCG	Fusion-PCR <i>phU</i>
P4-GFP-puZ	GGTCATCCGGACAACATCATGGAGCTGGTGCAGGC G	Fusion-PCR <i>puZ</i>
AN5ZF13	CGTCTTTGCACCTCCTATTTG	Fusion-PCR <i>puZ</i>
AN5Zseq-F1	ATGCGCCTCGATCGTTG	Secuenciado transformantes <i>A. nidulans</i> con <i>cassette</i>
AN5Zseq-F2	TGTGAGCTTCTGGAATGTCG	
ANgfpseq-R1	ACCTTCACCCTCTCCACTGA	
Rib82seq-R2	CTGTTGCCAGGTGAGGGTAT	
Rib82seq-F3	CCATTTGCTCCAATGAACCT	
ANactin_qF1	TCCCGCCTTCTACGTCTCTA	acnA (<i>A. nidulans</i>) qPCR
ANactin_qR1	TGGGTAACACCATCACCAGA	
PhZ-qF2 (*2)	ATCCTCGACACGACTGGAAC	<i>phZ</i> en qPCR
PhZ-qR2 (*2)	GTTCTCAAAGTCGAGCGTCA	
PhU-qF7 (*2)	GCTGCATGTTCTCATCCTC	<i>phU</i> en qPCR
PhU-qR5 (*2)	CCACCAAGGACGGGATTC	
puZ-qF6	CTCGATTTGAGAGGAGCAC	clonado <i>puZ</i>
puZ-qF16	TGTGACGGCTTTCATCGAG	
puZ-qR6	TCTCGATGAAAGCCGTCAC	

Materiales y Métodos

puZ-R11	CTGCCGGACCTCCTCAAC	clonado <i>puZ</i>
puZ-R12	ATCGGCAAGTTGGCTAACAA	
puZ-R16	GTGCTCCTCTCGAAATCGAG	
puZ-R17	TCGCAATAGCCAGAGAGGTT	
puZ-R18	CAGGAGCGACAATATGACGA	
psZ-F1	GCCGGCGATAACGAAACT	
puZdeg-F11	GCCGGCGATMACGAARYT	
puZ-cF2	ATGCAGCCGGCGATAAC	
psZ-F2	GTGGCCAGATCGTTCGTC	
puZdeg-F17	GTGGCSAGATCSTTCGTB	
puZc-R1	ATCGGCAAGTTGGCTAACAA	
PuZ-cRc2	GCCCAAAAATTGTTCAATGATG	
PuZseqR20	CTTCGTCGGTCGTTGGTT	
mphZ_L124M_F1	ATGGCGCCCGGAaTgGGTTGAACGCATAC	Mutación PhZ
mphZ_L124M_R1	TATGCGTTCAACCCcAtTCCGGGCGCCATG	L124M
mphZ_T131A_F2	AACGCATACTTCgCcTACTCGGTTGTTGGTTTCCAC	Mutación PhZ
mphZ_T131A_R2	TGGAACCAACAACCGAGTAcGcGAAGTATGCGTTC	T131A
mphZ_S133T_F3	GTTGAACGCATACTTCACATACaCtGTTGTTGGTTTCCAC	Mutación PhZ
mphZ_S133T_R3	GTGGAAACCAACAACaGiGTATGTGAAGTATGCGTTC AAC	S133T
mphZ_I388V_F5	TGTCACCGCGTTCgTCGAGTCCGCG	Mutación PhZ
mphZ_I388V_R5	GGACTCGAcGAACGCGGTGACAGGG	I388V
mphZ_A391G_F6	GTTCATCGAGTCCGgtACCGGTATCTCCGAG	Mutación PhZ
mphZ_A391G_R6	TCGGAGATACCGGTACCGGACTCGATGAACG	A391G
mphZ_T392A_F7	ATCGAGTCCGCGgCCGGTATCTCCG	Mutación PhZ
mphZ_T392A_R7	GGAGATACCGGcCGCGGACTCGATG	T392A
mphZ_Y54G_F1	TGGGCCCGCATGGCGggCATCATCTCGGTG	Mutación PhZ
mphZ_Y54G_R1	CACCGAGATGATGccCGCCATGGCGGCCCA	Y54G
mphZ_V58A_F	CGTACATCATCTCGGcGAACGCCTCCATCATCTCG	Mutación PhZ
mphZ_V58A_R	CGAGATGATGGAGGCGTTCgCCGAGATGATGTACG	V58A
mphZ_A128F_F2	GGACTCGGGTTGAACTtcTACTTCACATACTCGGTTGT TGGT	

Materiales y Métodos

mphZ_A128F_R2	ACCAACAACCGAGTATGTGAAGTAGAAGTTCAACC CGAGTCC	Mutación PhZ A128F
mphZ_Y129D_F3	GACTCGGGTTGAACGCAgACTTCACATACTCGGTTG	Mutación PhZ
mphZ_Y129D_R3	CAACCGAGTATGTGAAGTcTGC GTTCAACCCGAGTC	Y129D
mphZ_A148V_F	CATCACGTACCGCGAGGCiCTCGCTGCGGTCTTCCTT G	Mutación PhZ A148V
mphZ_A148V_R	CAAGGAAGACCGCAGCGaGAGCCTCGCGGTACGTG ATG	
mphZ_A418V_F	CTTCATCAGCGTGTCTTCGtCCCGATCTTTGCGAGC AT	Mutación PhZ A418V
mphZ_A418V_R	ATGCTCGCAAAGATCGGGaCGAAGAACACGCTGATG AAG	
mphZ_T429P_F	CATCCCCTCCTGGGCTcCAGGCGGTGCCCTCG	Mutación PhZ
mphZ_T429P_R	CGAGGGCACCGCCTGgAGCCCAGGAGGGGATG	T429P
A120Q_F (*3)	TCGATGCGGAGACGTCTcaGTATATGATCTCGGCCT	Mutación PhU
A120Q_R (*3)	AGGCCGAGATCATATACTgAGACGTCTCCGCATCGA	A120Q
P546G_F (*3)	GATTGTTCTTAGCACAggCTTTCTGGTCGCTG	Mutación PhU
P546G_R (*3)	CAGCGACCAGAAAGccTGTGCTAAGAACAATC	P546G
S458A_F(*3)	CGTGCTTGCAAGATCgCcGGTGTCTTCCTC	Mutación PhU
S458A_R(*3)	GAGGAAGACACCgGeGATCTTGCCAAGCACG	S458
pCR21_ampF1(*2)	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Verificación de insertos en pGemT Easy
pCR21_ampR1(*2)	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	
pCR21_seqF1(*2)	GGATAACAATTTACACAGG	Secuenciación de insertos en pGemT Easy
pCR21_seqR1(*2)	GGCGATTAAGTTGGGTAAC	

phU

ATGCTGTGACCACTCGATTGTGAAGGACCAGCCTGGTGGCGTGCCTGCC

PhU-cF2
M S D H S I V K D Q P G R V P S P

51 GACTGTGCAGCCGTGGGCCCCACGAGCGCAGTCCGCCCGCGCTCGGCCGCTTGGCCACAAGTTTGGCAAGCGCGAGGGGCTGGCTTGG
T V H A V G P T S A V R R R L G R L A H K F A T R E G W L G

141 GGACTACAACCTATGCGTGGCTCTGTACGCCGACGCTGCCCTTTGCCGTCGGTGGTCCGAGCGCAAGACGATGCCGCCATTCTATGCACT
D Y N Y A W L C T P T L P F A L G G R R R R K T M P P F Y A L

231 CGACTCCGACCTCCCGCTCCTGCTTCGCGCTCGCGGTCCAGCATGCGCTTGGGATGCTTGGGGGCTTATCAGGCCCGCGATCAT
D S D L P L L L A L A C G L Q H A L A M L A G L I T P P I I

321 CTTGGCGATGCACTCAGCCTCGATCGCGAGACGCTCGGATATATGATCTCGGCCCTCCCTCATTGGATGTGtgagtatgaatgegttea
A120Q
F A S A L S L D A E T S Y M I S A S L I G C

411 tgtgaatactgtcegettatacettttgeagGTATTCTTAGTCTGGTGCAGATGCCAGGATACACTGTTCAGAAGCTACTATCTTGGC
G I L S L V Q M S R I H L F K N Y Y L G

501 ACCGGCCTGATCAGCGTGGTGGGACCAGCTTTGCCGACCTGAGTACGGCGAACCGGtaegteectecacagtgegegettcegege
T G L I S V V G T S F A T L S T A N A

591 tetaaectegcatgtagATATTGATGCGATGTACGCCGAGGTACACTGCCCTTCGACCACCGGGCAGATGGCACTGTCACTCGCGGACC
I F D A M Y A D G T C P S T T A A D G T V T R G P

681 ATGTCGGGACGCTTACGGCATGGTGGTGGGAACGTCCATCATCTGCTGCTCCCTCGAAATTTCACTGCTTCGGTCCCGCCGCGTATTCT
C P D A Y G M V L G T S I I C S F L E I F M S F V P P R I L

771 CCAGAGGATATCCCGCGATGGTCACTGGCACTGTCACTCCCTTATGATCGGAGCGTCCGCTTGTGGCTCGTGGGGCATCCCGGACTGGGG
Q R I F P P M V T G T V I L M I G A S L V G S S G I P D W G

861 TGGCGGCTCGAACGACTGCATGAGCAGGCTGGGTCGGGATCTCTGGGCTATGTCCGGACGCTCTGCGCGCGGGCCACTGCCGTGGGG
G G S N D C M S R P A S G F F A L C P D V S A P R P L W G

951 CTCGCCAGAGTTTACCGCCCTTGGCTTCTCTCCTTCGCTGCATCATCACGGAGCTCTTCGGCTCGCGCTTCTCAAGAACAATATC
S P E F I G L G F L S F V S I I I T E L F G S P F L K N I S

1041 CATCATCGTCGGCCTCGCCGTCGGCTGCATCGTCGCGAGGCTAGCGGGCTACATTGACGGGAAGCAGATCTCGAGCGCCCGCGCATCAC
I I V G L A V G C I V A G V A G Y I D G S T I S S A P A I T

1131 ATTCTGTGGGTGACCCGCTTCAAGCTCCGTGTCTACGCCAGCAATCTTGGCCATGTTGGGGTGTACGTGCTGCTGGCTATGGAGGC
F L W V H R F K L R V Y A P A I L P M F A V Y V S L A M E A

1221 GATTGGGCACATCACTGCGTCCCGGGAGTCTCGCGGCTGCCCGTCGACGGCGAAGAGTTCGACTCGCGCATCCAGGGTGGGCTACTCAG
I G D I T A S A E V S R V P V D G E E F D S R I Q G G V L S

1311 CGACGGCATCGCGGTTTCCCTCTCCGCACTTTTCCCGCTCACGGCTGTCGATCTTGGCCAGAATAACGGTGTCACTCCCATCACGGC
D G I G G F L S A L F T V T P L S I F A Q N N G V I A I T R

1401 CTGCGGAAACCGCACTGCGGGCGGCTTCTGCTGCATGTTCCCTCATCTCTTTGGCGTCTGGCAAGATCTCGGGTGTCTTCTCCGCGAG
PhU-qF7 S458A
C A N R T A G R F C C M F L I L F G V L G K I G V F L A

1491 tacgtgegeecttaegetgecegeectgeetgacaetgaecagecegegttagTCCCGAATCCCGTCTTGGTGGCGGTGACCAGCTTCTCTGT
PhU-qR7
I P N P V L G G V T T F L

1581 TCGCGTCGGTGGCGGTTTCTGGCATTGCGGTGCTCTCGTATTGCCGATTTACACGGCGAGATGCTTTGTGCTTGGCGCCGCTCTGTCGT
F A S V A V S G I R V L S Y C R F T R R D R F V L A A A L S

1671 TCGGTATCGGTGACCTCCTTGTGCCGACCATCTTTACGCACCTCTTCGATGGCGTTAAGCATOCAAACAAGGCGCTGCAGGCTTCTTCG
F G I G D L L V P T I F T H L F D G V K H P N K G L Q G F F

1761 ACTCTATAACGATTGTTCTTAGCACACCTgt.aagtggtaactggacaaecteggtgtaactcatggecegtgacttccgegegtgeag
P546Q
D S I T I V L S T

1851 TCTGTGCTGCTGGCATTGTGGCCGCGGTGCTAAACCAATACTGCCCTCAAGAAGATAAAGAAGAAGAGGATGAAGAGACAGGGGTGGAAG
F L V A G I V A A V L N Q I L P Q E D K E E E D E E T G V E

1941 TCATTGATGTCGAGGCCCATCACAGTCCGCTTGAGAAAGAGAAAGGACAGGGATTGA
PhU-cR2
V I D V E A H H S P L E K E K D R D *

Figura 6-1: Secuencia genes *phZ* y *phU*. En las secuencias se marcan en negrita y subrayado la ubicación de los primers que se describen en Tabla 6-2. Por información de secuencia y primers puZ dirigirse a Figura 4-4. En sombreado gris se marcan los residuos aminoácídicos que fueron mutagenizados.

6.5 Técnicas empleadas con *A. nidulans*

6.5.1 Análisis de crecimiento en placa

Las cepas a analizar se inoculan por picadura junto con cepas controles (silvestre, parentales, etc) en una misma placa de medio completo o medio mínimo (agregando una fuente de nitrógeno y los suplementos que permitan el crecimiento de todas las cepas) y se incuba a 37°C por 48 hs. Esta placa, denominada placa maestra, es la que se utiliza para inocular mediante un replicador las placas de medio mínimo (con diferentes fuentes de nitrógeno y suplementos). Para sembrar las colonias de la placa maestra se debe tener en cuenta el molde del replicador. Luego de la incubación se realiza la lectura de los fenotipos observando las características de cada colonia.

6.5.2 Obtención de cultivo monospórico (siembra por suspensión de esporas)

Se hace una suspensión de esporas en 1 ml de Tween 80 (0,01%) con punta (escarbadiente) a partir de un cultivo en medio sólido. Se homogeniza por vortex durante 1-2 minutos y se hace recuento de esporas en cámara de Neubauer. Se siembran dos diluciones correspondientes a 1-10 esporas/100 ml. Se incuba 2 días a 37°C. Se considera aislada aquella placa que tenga una única colonia.

6.5.3 Cultivo en medio líquido

Se recolectan las conidias en Tween 80 (0,01%), y se inocula cada erlenmeyer con medio mínimo, fuente de nitrógeno y suplementos (según cepa). Se incuba con agitación (100-150 rpm) tiempo y temperatura necesarios según la finalidad del cultivo

6.5.4 Transformación de *A. nidulans*

Producción de protoplastos: Se siguió el protocolo descrito en (Tilburn et al., 1983) con algunas modificaciones.

Se inoculan 400 ml de medio mínimo y los suplementos correspondientes con una suspensión de conidias (generada a partir de 2 placas confluentes en 15 ml de Tween 80 (0,01%)). Se incuba a 28°C y 150 rpm durante 12 horas, se sigue el cultivo al microscopio y se detiene cuando las esporas comienzan a germinar. El micelio se filtra a través de blutex, se lava con agua estéril y se seca entre hojas de papel estériles. El micelio seco se pesa por diferencia en un falcon estéril y se resuspende en solución B (10 ml/g de micelio), se homogeneiza por vortex y se transfiere a un matraz estéril agregando por cada gramo de micelio 3-7 mg de albúmina de suero bovino (BSA) y 300-400 mg Glucanex (Novozyme). Se incuba durante 1-2 horas a 30°C y 100 rpm, siguiendo la formación de protoplastos al microscopio. La suspensión de protoplastos se transfiere a tubos corex estériles se homogeneiza por vortex suavemente y se le agrega lentamente por la pared del tubo un volumen igual de solución D. Los tubos deben mantenerse en hielo y se debe observar la formación de 2 capas. Se centrifuga 10 min. a 6000 rpm a 14°C. Los protoplastos forman una capa blanca en la interfase que se transfiere con pipeta Pasteur a otro tubo corex estéril, se lava agregando 5 ml de solución E y se centrifuga 10 min. a 4000 rpm. Los protoplastos se resuspenden en 5 ml de solución G para realizar el recuento en cámara de Neubauer. Se centrifugan 10 min. a 4000 rpm y se resuspende la cantidad de solución G necesaria para obtener una concentración de $2-5 \times 10^7$ protoplastos/100 μ L.

Transformación: Se siguió el protocolo descrito en (Szewczyk et al., 2006).

A 100 μ L se le agrega no menos de 250 ng de ADN (volumen menor a 15 μ L). Se homogeneiza por vortex 6-8 veces por 1 segundo a máxima velocidad y se agrega 50 μ L de solución de PEG (recién filtrada) se homogeneiza por vortex 3-4 veces por 1 segundo a máxima velocidad y se deja en hielo durante 25 minutos. Luego se agrega 1 ml de solución PEG, se mezcla con micropipeta por lo menos 10 veces y se deja a temperatura ambiente durante 25 minutos. El volumen total de transformación se plaquea (150

$\mu\text{L/placa}$) en medio mínimo 1 M de sacarosa con los suplementos adecuados. Se incubaba a 37° hasta la visualización de colonias (3-5 días).

Soluciones de transformación:

B: 1.2 M MgSO_4 , 10 mM ortofosfato (se ajusta el pH a 5.8). Se esteriliza por filtración.

D: 0.6 M sorbitol, 100 mM Tris Cl pH 7.5.

E: 1 M sorbitol, 10 mM Tris Cl pH 7.5.

G: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl_2 .

PEG: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl_2 , 75 mM polietilenglicol (= 25% w/v). Se filtra antes de usar. Las soluciones D, E, G y PEG se esterilizan por calor húmedo.

6.5.5 Microscopía de fluorescencia

Las cepas a observar se crecen sobre la superficie de un cubreobjetos. Se utilizan cubreobjetos de vidrio redondo de 14mm de diámetro (esterilizados mediante flameado) que son colocados en placas de 12 pocillos. A cada pocillo se le agrega 3 ml de medio mínimo sin fosfato (MM-P), con 25 mM NaH_2PO_4 , los suplementos correspondientes y la fuente de nitrógeno elegida. Cada pocillo se inoculó con 10 μL de una suspensión en Tween 80 (0,01%) de la cepa de interés de 10^6 esporas/ml y se incubó a 28°C durante 14 horas. Para la observación, el exceso de medio del cubreobjetos se escurre sobre una servilleta y se dispone sobre un portaobjetos. Las muestras se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i, equipado con un filtro B-2E/C (Nikon) para visualizar la fluorescencia emitida por GFP y un filtro B-2A para visualizar la fluorescencia emitida por CMAC. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital DS-Fi1 (Nikon) y se utilizaron los programas de obtención y tratamiento de imágenes NIS-Elements F3.0 y Adobe Fireworks CS4.

6.5.6 Ensayos de captación de purinas radiomarcadas (*uptakes*)

Los ensayos de captación de [2,8-³H]-hipoxantina y [8-³H] xantina (19,5 Ci/mmol y 7 Ci/mmol, respectivamente; Moravek Biochemicals.) se realizaron con esporas de las cepas de *A. nidulans* en germinación siguiendo el protocolo recomendado en (Kryptou & Diallinas, 2014). 25 mL de Medio Mínimo con nitrato y los suplementos nutricionales correspondientes se inocularon con 10⁸ esporas y se incubaron durante 3 horas y media a 37 ° C, 140 rpm. Para la determinación de este tiempo se evaluó microscópicamente la germinación de las cepas PhZwt y PhUwt a los 120, 180, 195, 210 y 240 minutos. 210 minutos fue el tiempo justo antes de la aparición del tubo germinal. Las conidias se centrifugaron durante 5 minutos a 3000g y se resuspendieron en 3 mL de Medio Mínimo. 75 µL de esta suspensión de conidias se incubó a 37° durante 5-10 minutos antes de agregar el sustrato radioactivo. Luego del agregado de éste (0,7 µM) se cronometró 1 minuto y se detuvo la reacción agregando una concentración en exceso (100 µL de solución 4 mM) del sustrato no marcado e incubando inmediatamente en hielo. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C y cada condición se ensayó por triplicado. Se centrifugó a 11.000g durante 3 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante mediante pipeta Pasteur con cuidado de no perder células. Se lavó el pellet con 1 mL de medio mínimo y se enfrió en hielo. Se vortexeo y se centrifugó a 11.000g durante 3 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante igual que en caso anterior y se resuspendió en 1mL de líquido de centelleo Ultima Gold XR (Perkin Elmer). Se midió en contador de centelleo *Microbeta Trilux* registrando el promedio de cuentas obtenidas en 1 minuto. A cada medida se le resta el valor de fondo determinado en cada ensayo mediante el valor de captación determinado en una muestra con el radioactivo y en simultáneo un exceso de sustrato no radioactivo. El valor de fondo además, fue validado mediante la determinación de la captación obtenida con la cepa ΔZAC. Ambos enfoques condujeron al mismo nivel de captación de fondo el cual fue menor al 5% de los conteos totales obtenidos con las que expresan la versión silvestre del gen. La determinación del tiempo de reacción se determinó evaluando diferentes tiempos de reacción (15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos y 16 minutos). Se determinó que al minuto de reacción la captación era lineal. Los valores de $K_{m/i}$ se obtuvieron mediante la realización y el análisis de captaciones utilizando una concentración fija de hipoxantina marcada (0,2 µM) y varias concentraciones de hipoxantina no marcada (0,1 µM -1 mM) de sustratos

no marcada. Los valores de K_i se calcularon a partir del valor de IC50 (concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición) utilizando el Software GraphPad Prism a partir de curvas de dosis-respuesta. En todos los casos el coeficiente de Hill fue cercano a -1 (compatible con la presencia de un sitio de unión). Se consideró K_i equivalente a IC50. a partir de la ecuación $K_i = IC50 / (1 + [S] / K_m)$, donde [S] es la concentración fija de sustrato radiomarcado utilizado (por lo menos 10 veces más baja que el valor de K_m). Para la puesta a punto se determinó el valor de $K_{m/i}$ para AzgA obteniéndose un IC50 de que coincide con el publicado (Cecchetto et al., 2004). Todos los ensayos de transporte se llevaron a cabo en al menos dos experimentos independientes, con tres réplicas para cada concentración o condición. La desviación estándar fue <20%. El valor de cuentas obtenidos se convirtió en moles de sustrato/min/ 10^8 conidias, a partir de la concentración y actividad específica del stock del sustrato radioactivo utilizado.

6.5.7 Técnicas empleadas con ácidos nucleicos

Salvo en los casos donde se especifica lo contrario se utilizaron los procedimientos estándares descritos en Sambrook & Russell (2001) con algunas modificaciones.

6.5.8 Preparación de las muestras para aislamiento de ácidos nucleicos.

Se tritura el micelio en mortero con N_2 líquido hasta obtener un polvo fino, se alícuota (50-100 mg) en eppendorf de 2 mL y se guarda a $-70^\circ C$ o se continua con el protocolo de extracción.

6.5.9 Extracción de ADN genómico de hongos

A cada eppendorf con micelio pulverizado se le agregan 900 μL de buffer de extracción, se homogeneiza por vortex y se incuba 5-10 minutos en hielo. Posteriormente se adiciona 1 volumen de fenol: cloroformo:isoamílico (25:24:1), se homogeneiza por vortex y se centrifuga durante 5 minutos a 12000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se agrega 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1), se homogeneiza por vortex, se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm y se recupera la fase acuosa. La precipitación se realiza con 1/10 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de EtOH 95% durante 20 minutos en hielo.

Materiales y Métodos

Se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, se lava el pellet con EtOH 70%, se resuspende en 50-100 µl de TE-ARNasa y se incuba durante 30 minutos a 37°C.

Buffer de extracción: 0.2 M Tris HCl pH7.5, 1% de SDS y 1mM de EDTA

TE-ARNasa: 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 1 mM de EDTA pH 8) y 10 µL ARNasa (10 mg/mL).

6.5.10 Extracción de ARN total

Se utilizó el kit RNeasy Plant mini kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante a partir de 50-100 mg de micelio pulverizado.

6.5.11 Extracción de ADN plasmídico

Para realizar la extracción de ADN plasmídico se realizan minipreparaciones partiendo de un cultivo de cada colonia aislada en 3 mL de LB ampicilina incubado toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se centrifugan 1,5 mL a 12000 rpm durante 2 minutos y se agregan 200 µL de solución I, 200 µL de solución II y 200 µL de solución III dejándolo 15 minutos en hielo. Se centrifuga durante 10 minutos a 12000 rpm y se recupera el sobrenadante. Se realiza una extracción con fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y se centrifuga durante 6 minutos a 9000 rpm. Posteriormente se agrega 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1) y se centrifuga durante 6 minutos a 9000 rpm. La precipitación se realiza con 2 volúmenes de EtOH 96% y 1/10 de volumen de NaAc 3M centrifugando durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en 30 µl de agua mQ.

TE: 10 mM Tris-HCl pH7.6 y 1 mM de EDTA pH8. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Solución I: 100 µl de ARNasa (10 mg/mL) en 10 mL de TE.

Solución II: 1% SDS y 0,2 M de NaOH. Se prepara en el momento antes de usar.

Solución III: 60 mL de KAc 5M, 11,5 mL de HAc glacial y 28,5 mL de H₂O. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

6.5.12 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó con algunas modificaciones del protocolo recomendado por el fabricante de la ADNasa y la transcriptasa reversa (Invitrogen). La eliminación del ADN presente se realiza en un volumen de reacción de 9,4 μL con 1 μL de buffer 10x, 0,4 μL de ADNasa (Invitrogen), 1 μg de ARN y agua DEPC. La enzima se deja actuar durante 17 minutos hasta la preinactivación con 1 μL de EDTA. Finalmente, la inactivación se realiza durante 10 minutos a 65°C. La reacción de RT-PCR se realizó con *primers* específicos según cada caso (Tabla 6-2). A los 10,4 μL de la muestra tratada con ADNasa se le agregó 1 pmol de cada *primer* específico y 1 μL de dNTPs 10 mM c/u (Promega), la mezcla se incubó por 5 minutos a 65°C y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se le adicionaron 4 μL buffer 5x, 2 μL dTT (0.1M) y 1 μL de RNasa OUT (40 U/ μL , Invitrogen) y se incubó durante 2 minutos a 37°C, por último se agregó 1 μL MMLV (200U, Invitrogen) se incubó durante 50 minutos a 37 °C y luego 15 minutos a 70°C. Al ADNc sintetizado se le agregó 2 unidades de RNasa H (Fermentas) y se incubó durante 20 minutos a 37°C.

6.5.13 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

La técnica de RACE que se utilizó para la amplificación del extremo 5' de *puZ* se siguió según el protocolo descrito por el fabricante del kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Life Technologies). El ADNc se sintetizó con un *primer* específico (*puZ*-R6, *puZ*-R16). Al ADNc obtenido se le adicionan citosinas en el extremo 5' mediante una una transferasa terminal de desoxinucleótidos. Posteriormente se amplifica con un *primer* oligodG que hibrida (con cola adaptadora) y un *primer* reverso específico (*puZ*-qR17, *puZ*-R16). El producto obtenido se amplificó en una segunda ronda con un primer que hibrida con la secuencia adaptadora y un primer reverso específico más interno (*puZ*-qR18, *puZ*-qR17). Para ver detalles de los *primers* (Tabla 6-2.).

6.5.14 Amplificación mediante PCR convencional

Las amplificaciones para verificación de clones con inserto se realizaron con la enzima Taq Pol (Invitrogen) en un volumen final de 25 μL con: 2,5 μL de buffer de Taq Pol, 1

Materiales y Métodos

μL de MgCl_2 , 2,5 μL de dNTPs (10 mM) (Promega), 1,5 μL de cada primer (10 μM), 0,25 μL de Taq Pol y 10-100 ng de ADN. Se utilizó un programa de: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 2-5 minutos a 72°C, y por último 5 minutos a 72°C

Las amplificaciones de genes (completos), amplificaciones para Fusion-PCR y verificación de *cassette* se realizaron con la enzima Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific 2U/ μL) en un volumen final de 50 μL con: 10 μL de buffer de enzima, 2 μL de MgCl_2 , 5 μL de dNTPs (10 mM) (Promega), 2,5 μL de cada primer (10 μM), 0,5 μL de enzima y 10-100 ng de ADN. Para las amplificaciones de *phZ* y *puZ* se agregó 5 μL de DMSO (Sigma). El programa utilizado involucra una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98°C, y 30 ciclos de: 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 50-62°C (según el caso) y 2-3 minutos a 72°C (según el caso), por último 3 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación utilizada fue: 52°C (*phZ*), 50°C (*phU*), 62°C (*puZ*), 57°C (5'UTR de *azgA*) y 58°C (3'UTR de *azgA*). El tiempo de extensión fue: 45 segundos (5' UTR *azgA*), 2 minutos (3' UTR *azgA*), 1 minuto (*phZ*, *phU* y *puZ*). Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en termociclador Corbett (CG1-96). Para verificación de la integración del *cassette* en las cepas se utilizó el programa pero con 4 minutos de extensión y 59°C de hibridación para el *cassette* de *phZ* y *phU* y 62°C para *puZ*.

6.5.15 Fusion-PCR

Los *cassettes* 5'UTR_*azgA*-transportador-*gfp-ribo*-3'UTR_*azgA* se construyeron mediante el protocolo descrito por Szewczyk *et al.*, 2007 con algunas modificaciones.

Tanto para amplificar los componentes del *cassette* como para fusionarlos se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific 2U/ μL) en un volumen final de 50 μL , con los mismos componentes de reacción que los descriptos para PCR convencional con esta enzima.

Para amplificar los componentes se utilizó el programa descrito en PCR convencional a excepción de la amplificación de *gfp-ribo-3'* de *azgA* para lo cual se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98°C, luego 10 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C y 2 minutos y medio a 72°C, seguidos de 15 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C y 2 minutos y medio más 10 segundos en cada

ciclo a 72°C, por último una extensión final de 2 minutos y medio a 72°C. Para fusionar los componentes del *cassette* se utilizó el mismo programa pero con 4 minutos de extensión y 59°C de hibridación para el *cassette* de *phZ* y *phU* y 62°C para *puZ*. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en termociclador Corbett (CG1-96) y fueron purificadas (ver Sección 6.5.19).

Para ver detalles de la estrategia de construcción de *cassettes* dirigirse a la sección 6.5.18.

6.5.16 Amplificación mediante PCR en tiempo real

Los ensayos de qPCR para determinación del número de copias se realizaron utilizando QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Qiagen) en un volumen final de reacción de 10 µL conteniendo 0,5 µL de cada primer (6 µM) y 2 µL de ADNg (5 ng/µL). Las amplificaciones se llevaron a cabo (termociclador Corbett Rotor Gene™ 6000) utilizando un programa con una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos y luego 30 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización) y un minuto a 59°C (hibridación-extensión). Las reacciones se realizaron por duplicado. Como gen de referencia se utilizó el gen de la gamma actina de *A. nidulans* (*actA*), como calibrador se utilizó el ADN genómico de las cepas de *A. nidulans* PhZ::wt y PhU::wt (sección 6.1) con una única copia del gen *phZ* y *phU* respectivamente (Barraco-Vega et al., 2017; Solomon et al., 2008). Para determinar el número de copias se utilizó el método delta-delta Ct (Rao et al., 2013).

6.5.17 Mutagénesis sitio dirigida

Las mutaciones en el gen *phZ* se introdujeron en el plásmido pMB02 (Tabla 6-1) mediante el método descrito en (Ishii et al., 1998; Munteanu et al., 2012) con algunas modificaciones del protocolo. Los *primers* se diseñaron de forma tal de que el *Forward* y el *Reverse* tuvieran un solapamiento total o casi total, que el cambio a introducir quedará situado en la parte central de los *primers* y que la longitud fuera de 25-45pb (Ver Tabla 6-2). Las amplificaciones se realizaron con Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific 2U/µL) en un volumen final de 50 µL con: 10 µL de buffer de enzima, 5 µL de MgCl₂, 5 µL de dNTPs (10 mM) (Promega), 5 µL de DMSO (Sigma), 2,5 µL de cada primer (10 µM), 0,5 µL de enzima y 200 ng de vector. Se utilizó un programa de 30 segundos a 94°C y 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C y 6 minutos a 72°C. Para eliminar la

hebra parental del plásmido el producto obtenido se trató con DpnI (Fermentas) en un volumen de reacción de 20 μ L se agregaron: 2 μ L de buffer Tango (10x), 10 μ L del producto amplificado y 2 μ L de enzima (20 unidades) se incubó a 37°C durante 2 horas. El volumen total de digestión se dializó para eliminar sales y se transformaron células TOP10 de *E. coli* según el protocolo descrito en la Sección 6.5.4 Mediante secuenciación se verificó que los vectores seleccionados hubieran incorporado la mutación. Estos plásmidos se utilizaron como molde para la construcción del *cassette* de transformación.

6.5.18 *Cassette* de transformación

En esta sección se describe la estrategia utilizada para la construcción de los *cassettes* de transformación, para ver detalles de las PCRs dirigirse a la sección 6.5.15. Los plásmidos resultantes de la sección 6.5.17 se utilizaron como molde para amplificar con los *primers* PhZc-F1 y PhZc-R1 (Aii en Figura 6-2). El producto obtenido fue purificado y fusionado al extremo 5'UTR del gen *azgA* y *gfp-riboB*- 3'UTR de *azgA*. La región 5 UTR' del gen *azgA* (850 pb hasta el codón de iniciación) se amplificó a partir del plásmido p5'*azgA* desarrollado en (Barraco-Vega, 2014) usando el *primer* reverso P3-phZ que además de 20 nucleótidos específicos de la secuencia contiene los primeros 20 nucleótidos de *phZ* , junto al primer forward P1AN5ZF1 (Ai en Figura 6-2). La secuencia *gfp-riboB*-3'*azgA* se amplificó a partir del plásmido p3'*azgA* desarrollado en (Barraco-Vega, 2014) usando el *primer forward* P4GFPphZ1 que incluye 20 nucleótidos adicionales que complementan con el final de *phZ* sin incluir el codón de terminación, junto al *primer reverse* P6AN3ZR1 (A iii en Figura 6-2). De esta forma se generaron amplicones 5' y 3' que solapan en 20 nucleótidos con el gen *phZ* mutado y por tanto los tres fragmentos actúan tanto de ADN molde como de *primers* en la PCR final con los *primers* P2AN5ZF1 y P5AN3ZR1 (Figura 6-2 B). El producto obtenido consiste en única molécula integrada: 5'*azgA-phZ* mutado-*gfp-riboB*-3'*azgA* (Figura 6-2). Este procedimiento se realizó para las 13 mutaciones y con cada uno se transformó la cepa de *A. nidulans* Δ ZAC según el protocolo descrito en 6.5.4.

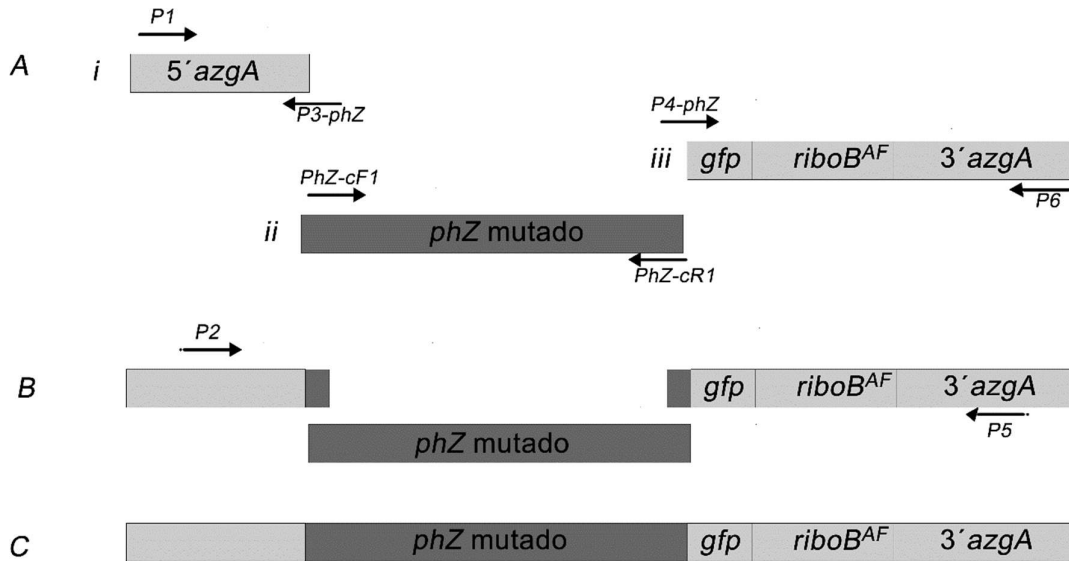


Figura 6-2: Esquema de la construcción del *cassette* 5'UTR_ *azgA*-*phZ* mutado-*gfp*-*riboB*-3'UTR_ *azgA*. A) Se realizan tres PCR individuales: i) se amplificó p3'*azgA* con P1AN5ZF1 (P1) y P3-phZ (P3-phZ), ii) los plásmidos con cada mutación se amplificaron con PhZc-F1 y PhZc-R1, iii) p3'*azgA* se amplificó con P4GFPphZ y P6AN3ZR1. B) Unión de los fragmentos obtenidos mediante Fusión-PCR con los *primers* P2AN5ZF2 y P5AN3ZR2 C) El producto esperado (6487pb) tras la fusión tiene la mutación introducida. Para las secuencias de los *primers* ver Tabla 6-2.

Para generar las variantes de PhU con los cambios A120Q, S458A y P546G se realizó una mutagénesis sitio dirigida durante la construcción del *cassette*. Los *cassettes* también se construyeron mediante Fusión-PCR, pero en este caso la mutación se introduce al unir los dos fragmentos que se solapan en la región de la mutación (Figura 6-2). Uno de los fragmentos (denominado Bi en Figura 6-3) comprende el 5'UTR del gen *azgA* de *A. nidulans* seguido de parte del gen *phU* de *P. chrysosporium* hasta la mutación que se quiere insertar. El segundo fragmento (denominado Bii en Figura 6-3) comienza con la otra parte del gen *phU* (mutado) unido al gen *gfp*, lo sigue el marcador de selección *riboB* y el 3'UTR de *azgA*.

Ambos fragmentos se obtuvieron a partir del ADN genómico de la cepa PhU(wt). Esta cepa contiene en el locus del gen *azgA* el *cassette* que se quiere introducir, pero con el gen *phU* silvestre. Así el fragmento 5' se obtuvo utilizando un *primer forward* (P1AN5ZF1) que hibrida con el extremo 5' del *cassette* y un *primer reverse* que es complementario a la región de *phU* que se quiere mutar y contiene el cambio a introducir. El fragmento 3' se obtuvo utilizando un *primer forward* que contiene la mutación y un *reverse* (P6AN3ZR1) que hibrida con el extremo 3' del *cassette*. Los *primers* (31-36 pb) que contienen las mutaciones fueron diseñados complementarios a la región a mutagenizar, quedando la mutación centrada y siendo totalmente solapantes entre ellos

(Tabla 6-2). Los fragmentos obtenidos mediante estas PCRs (portadores de la mutación en cuestión) fueron purificados y fusionados mediante PCR utilizando los *primers* P2AN5ZF2 y P5AN5ZR2 que se ubican en los extremos 5'Z y 3'Z del *cassette* pero son más internos que los de la primera amplificación. El producto obtenido de 6537 pb se purificó mediante kit Qiagen. Con cada uno de los productos transformó la cepa de *A. nidulans* ΔZAC según el protocolo descrito en 6.5.4. Las mutaciones de *phU* fueron realizadas en el marco de la tesina para la obtención del título de Licenciada en Bioquímica de Juliette Dourron bajo la tutoría de Gianna Cecchetto y Mariana Barraco (Dourron, 2017).

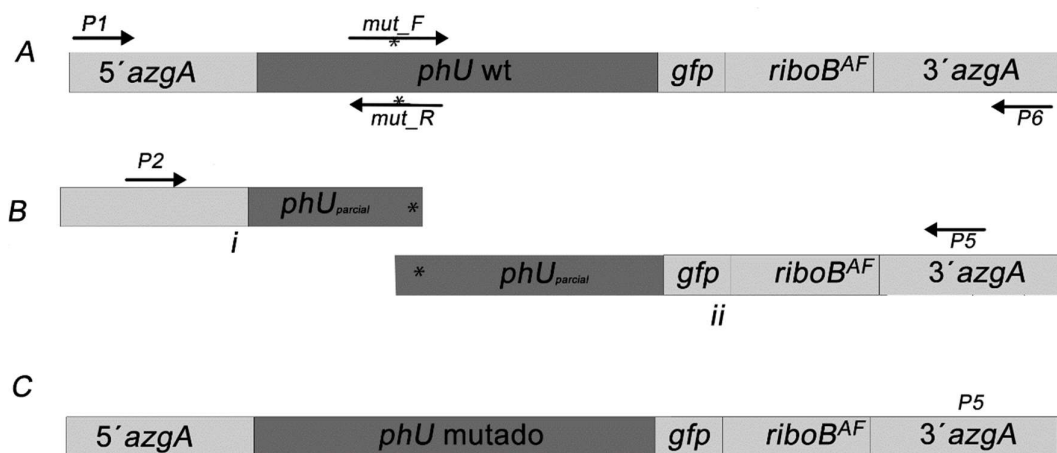


Figura 6-3: Esquema de la construcción del *cassette* 5'UTR_azgA-*phU*_mutado-*gfp*-*riboB*-3'UTR_azgA. A) Se realizan dos PCR individuales usando como molde ADN genómico de la cepa *PhU*:wt una con el primer P1AN5ZF1 (P1) y el primer reverso que contiene la mutación y otra con el *primer forward* que contiene la mutación y el *primer* P6AN3ZF6. Los *primers* que contienen la mutación a introducir se nombran mut_F y mut_R a modo ilustrativo (ver Tabla 6-2). B) Unión de los fragmentos obtenidos mediante PCR de fusión con los *primers* P2AN5ZF2 y P5AN3ZR2 y además las regiones con la mutación (*) se solapan y también actúan como “*primers*”. C) El producto esperado (6537 pb) tras la Fusion-PCR tiene la mutación introducida.

6.5.19 Purificación de productos de PCR

Los productos de amplificación utilizados como componentes a fusionar para la construcción del *cassette* se purificaron mediante *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) según el protocolo recomendado por el fabricante. Los productos se eluyeron en 30 μL de buffer TE (1X).

6.5.20 Electroforesis de ADN

Para visualizar ADN genómico, plasmídico y productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TBE 0,5x con 0,2 μL/mL de Goodview™.

Las muestras se sembraron con ayuda del buffer de carga 5x. La corrida se realizó a 100-150 V durante 30-60 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific

Buffer Tris Borato (TBE) (10X): 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8) en 1 L de agua destilada.

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

6.5.21 Clonado en vector T

Los productos de PCR se corren en un gel de agarosa para escindir las bandas y purificarlas. Para llevar a cabo la purificación mediante minicolumnas Wizard (Promega), las bandas se cortan en trozos y se introducen en las columnas y se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realiza la precipitación con 1/10 de volumen de NaAc y 2 volúmenes de EtOH absoluto durante toda la noche a -20°C. Luego se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 13000 rpm, se lava con 1 mL EtOH 70% y se centrifuga 15 minutos a 4°C a 13000 rpm. El pellet se seca y se resuspende en 10-20 µL de agua mQ. El clonado en los vector pCR 2.1 (Invitrogen) y pGemT Easy (Promega) se llevaron a cabo según las recomendaciones de los fabricantes Los productos de ligación se precipitaron con ARN-t y se transformaron células TOP10 de *E. coli*. mediante electroporación. Las PCR para clonado en vector T se realizaron con enzima Kapa 2G según indicaciones del fabricante.

6.5.22 Precipitación de los productos de ligación con ARN-t

La mezcla de precipitación se realiza con 5 µL del producto de ligación, 5 µL de ARN-t (0,2 µg/µL) (Invitrogen), 10 µL de H₂O mQ y 50 µL de EtOH absoluto. Se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a 4°C. El pellet se lava con 100 µL de EtOH 70% y se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a 4°C, se deja secar y se resuspende en 2 µL de H₂O mQ (Zhu & Dean, 1999).

6.5.23 Transformación de células de *E. coli* mediante electroporación

Para llevar a cabo un proceso de transformación mediante electroporación en primer lugar se descongelan las células en hielo y se agregan a la ligación precipitada con ARN-t. Se transfiere la mezcla a la celda (0,2 cm), se electropora (modo Ec2, equipo MicroPulser™ BIO-RAD) y se agrega 1 mL SOC. Los parámetros de pulso deben ser de aproximadamente 5 milisegundos y entre 2,5 y 3 Kv. La mezcla de transformación se incuba con agitación durante 1 hora a 37°C. Se plaquea 1/10 del producto de transformación en placas de LB ampicilina con X-gal e IPTG y se incuba a 37°C no más de 20 horas.

6.5.24 Preparación de células electrocompetentes

Para la preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* Top 10 se realiza un precultivo en 3 mL de LB que se incuba toda la noche a 37°C. Con 1 mL de precultivo se inoculan 250 mL de LB y se incuban a 37°C a 300 rpm donde se dejan crecer las células hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se transfiere el cultivo a tubos de centrifuga y se deja en hielo durante 20 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 4000 g, se elimina todo el sobrenadante, se resuspende en 1 volumen de glicerol 10% y se centrifuga en las mismas condiciones. Se resuspende en ½ volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar. Posteriormente se resuspende en 1/25 volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Por último se resuspenden en 1 mL de glicerol 10%. Se alicuotan 50 µL de las células en eppendorf, se congelan en N₂ líquido y se guardan a -70°C. La evaluación de las células competentes se realiza mediante electroporación con 10 pg del plásmido pUC19. Se debe obtener una eficiencia de transformación igual o mayor de 10⁸ transformantes por µg de vector electroporado.

6.5.25 Síntesis génica

Los 1725 pb de secuencia codificante de *puZ* se sintetizaron en la empresa *Macrogen* (Corea del Sur) junto a 36 pb que se corresponden con los últimos nucleótidos del 5'UTR de *azgA*. Con el plásmido recibido se transformaron células TOP10 de *E. coli* mediante

electroporación. Los plásmidos resultantes fueron purificados y utilizados como molde para la amplificación con 5ZF13 y puZ-cR1 (Tabla 6-2).

6.5.26 Secuenciación de ADN

El secuenciado fue realizado por la empresa Macrogen (Corea del Sur) con los *primers* descriptos para ese uso en Tabla 6-2.

Secuenciación de ARN (RNA-seq).

Se utilizó ARN extraído de un cultivo de *P. atropurpurascens* de 3 días en 1,25% de Extracto de Malta y 1,5% de peptona. La calidad del ARN total se comprobó con un bioanalizador Bioanalyzer RNA 6000 Nano (Plataforma de secuenciación Masiva IIBCE). El número de integridad del ARN (RIN) fue de 7,7. Tanto la preparación de la biblioteca como la secuenciación fue realizada por la empresa Macrogen (Corea del Sur). Se utilizaron 10 µg de ARN total para la construcción de la biblioteca de ADNc. Se usó el kit TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La biblioteca se secuenció utilizando el secuenciador Illumina HiSeq 2000 en una ejecución de 100 pb de extremos emparejados.

6.6 Técnicas de estudio de proteínas

6.6.1 Extracción de proteínas totales

Se inocularon 200 mL de MM líquido (con nitrato como fuente de nitrógeno y los suplementos nutricionales necesarios) con una suspensión de esporas de una placa de conidias de la cepa en cuestión en 7.5 mL de 0.01% Tween 80. Se incubó 14 horas a 32°C 140 r.p.m. Se filtró el cultivo y se molió el micelio en presencia de nitrógeno líquido. Se tomaron 200 mg del micelio molido y se resuspendieron en 1 mL Buffer de Precipitación. Se vortexó por 10-20 segundos y luego se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó por 10 minutos a 4 °C (máxima velocidad, 15800g). Se removió el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL EtOH 100% helado. Se centrifugó por 5 minutos a 4 °C (máxima velocidad, 15800g) y se removió el sobrenadante. Se lavó el pellet 2 veces con 1 mL de acetona helada. Luego de lavado se dejó secar el pellet a 60 °C por 30 minutos para luego

resuspenderlo en 400 μ L de Buffer de Extracción. Se centrifugó 15 minutos a 4 °C (máxima velocidad, 15800g) y se tomó el sobrenadante. El extracto proteico obtenido fue cuantificado por el método de BCA con el kit Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones realizadas por el fabricante.

Soluciones:

Buffer de Precipitación: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 12.5 % TCA.

Buffer de Extracción: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM EDTA, Inhibidores de proteasas SIGMA para hongos (1:500).

6.6.2 Análisis de la calidad de los extractos proteicos por SDS-PAGE

Para el análisis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó un gel concentrador al 6% de poliacrilamida y un gel separador de poliacrilamida al 12%. Previo al cargado de las muestras se agregó a las mismas buffer de carga a concentración final 1X y se las hirvió durante 5 minutos, enfriándolas en hielo. Se cargaron 4 μ L del marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder (Maestrogen). Se realizó la electroforesis en buffer de corrida 1X a 15 mA por gel durante la corrida en el gel concentrador y a 30 mA por gel durante la corrida en el separador.

Se realizó la visualización de proteínas mediante tinción con Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich) incubando el gel en la solución de tinción de un día para el otro. Luego se decoloró con solución decolorante hasta la visualización de las bandas.

Soluciones y reactivos

Buffer de carga 4X: Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; Glicerol 40%; SDS 4%; 2-Mercaptoetanol 4%; Azul de bromofenol 0,02%

Buffer de corrida 1X: Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% pH 8,3

Solución de Coomassie Blue: Coomassie Blue R-250 0,2%; Etanol 30%; Ácido acético 7%

Solución decolorante: Etanol 30%; Ácido acético 7%

6.6.3 *Western blot*

50 µg de proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE (10%). Previo al cargado de las muestras se agregó a las mismas buffer de carga a concentración final 1X y se las incubó a 37 °C durante 15 minutos. Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas por 1 hora a 120 V (Mini Trans-Blot®Electrophoretic Transfer Cell BioRad) a una membrana de nitrocelulosa (0.45 Micron, Thermo Scientific). La membrana fue luego incubada en Stripping Buffer (10 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS y 100 mM-mercaptoetanol) por 30 minutos a 55-60 °C (Kaur & Bachhawat, 2009). Luego de realizar 3 lavados de 10 minutos en TBST, se incubó la membrana O.N en Solución de Bloqueo y se procedió a la inmunodetección de las proteínas de interés. Para la inmunodetección de PhZ-GFP y GFP libre se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP de ratón (clones 7.1 y 13.1, Roche Applied Science), y para la detección de la α -actina un anticuerpo primario anti-actina de ratón (clón C4, MP Biomedicals). En ambos casos se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG_ratón de oveja conjugado a la peroxidasa de rábano (GE-Healthcare). La membrana fue revelada con un reactivo quimioluminiscente (Novex^R ECL HRP, Invitrogen) y las imágenes fueron tomadas utilizando el software Genesys del sistema GBox (Syngene) registrándose la señal luego de seis exposiciones de 10 segundos cada una.

Soluciones:

Buffer de Transferencia: 48 mM Tris Base, 39 mM Glicina, 20% Etanol, 0.037% SDS, H₂O mRo c.s.p. 1000 mL

TBST: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.

Solución de bloqueo: 5% leche descremada en polvo disuelta en TBST

6.7 **Análisis Bioinformáticos**

6.7.1 **Ensamblaje del transcriptoma**

Los alineamientos se analizaron usando como referencia el genoma de *P. strigosozonata*. Las lecturas sin procesar se filtraron con Trimmomatic (Bolger et al., 2014) y las lecturas de buena calidad resultantes se ensamblaron utilizando Trinity (Grabherr et al., 2011). La

calidad del transcriptoma ensamblado se verificó con Transrate (Smith-Unna et al., 2016). Para cada transcripto, se obtuvieron todos los marcos de lectura abiertos de más de 90 nucleótidos usando getorf (Rice et al., 2000). El análisis de RNA-seq fue realizado por el Lic. Andrés Milano y el Dr. Pablo Smircich (Departamento de Genómica del Instituto de investigaciones Clemente Estable) en marco del proyecto CSIC “Dilucidando el sistema ligninolítico: del transcriptoma a la actividad enzimática” (Responsable: Dra. Gianna Cecchetto).

6.7.2 Análisis de secuencias *in silico*

Bases de datos utilizadas: “*Aspergillus* Comparative Database” (Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus>), Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>), “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y “Transporter Classification Database” (<http://www.tcdb.org/>).

Programas utilizados:

Alineamiento de secuencias:

- ClustalW:

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

- Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Predictor de estructura secundaria de proteínas:

- MemBrain: Transmembrane protein structure prediction: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/> (Yin et al., 2018).
- Sosui: http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html

Secuencias analizadas:

Materiales y Métodos

Proteínas NAT: UapA y UapC de *A. nidulans* (GI: 88984992, 790973); Lpe1 de *Zea mays* (GI: 162462794); SNBT1 de *Rattus norvegicus* (GI: 284010030); SVCT1 y SVCT2 de *Homo sapiens* (GI: 6652824, 6048257); XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG de *E. coli* (GI: 161784262, 84028014, 85675700, 187775829 y 89107857, respectivamente); PucJ de *Bacillus subtilis* (GI: 16080296) y PyrP de *Lactococcus lactis* (GI: 15673585).

Proteínas AzgA-like: AzgA de *A. nidulans* (GI: 67903094); AfAzgA de *A. fumigatus* (GI: 70997864); Atzg1 y Atzg2 de *A. thaliana* (GI: 9759032, 9759032); PurP, YicO, YjcD y YgfQ de *E. coli* (GI: 16131582, 161784317, 84028043, 55977858); BBB22 y BBB23 de *B. burgdorferi* (GI: 11497023, 364556795).

Hipotéticas: GI: 358370293 (*A.kawachii*), GI: 189191058 (*P.tritici*), GI: 169622172 (*P.nodorum*), GI: 396492637 (*L. maculans*), GI: 116193889, GI: 367034109 (*M.thermoph*), GI: 596709773 (*C.gloespor*), GI: 453080163 (*S.musiva*), GI: 590012949 (*C.coronata*), GI: 358393328 (*T. atrovir*), GI: 119479369 (*N.fischeri*), GI: 512189572 (*O. piceae*), GI: 494830282 (*C.apollin*), GI: 398388717 (*Z. tritici*), GI: 451854940 (*B. sorok*), GI: 576917527 (*B. zeicola*), GI: 578485511 (*B. victoriae*), GI: 452001101 (*B. maydis*), GI: 573991943 (*C. militaris*), GI: 443411638 (*A. versicolor*), GI: 589991804 (*C. psammophila*), GI: 350639049 (*A. niger*), GI: 576930940 (*B. oryzae*), GI: 576035558 (*C. thermophil*), GI: 615469318 (*C. fioriniae*), GI: 402077590 (*G. graminis*), GI: 599156565 (*A. ruber*), GI: 315055049 (*A. gypseum*), GI: 213408273 (*S. japonicus*), GI: 400596682 (*B. bassiana*), GI: 472239713 (*B. fuckeliana*), GI: 310793980 (*C.graminicola*), GI: 584145752 (*F. verticillioides*), GI: 401882702 (*T.asahii*), GI: 156048879 (*S. sclerotiorum*), GI: 517318811 (*F. fujikuroi*), GI: 565936782 (*C. carrionii*), GI: 471559286 (*E. utyplata*), GI: 320589670 (*G. clavigera*), GI: 500251892 (*T. minima*), GI: 58997366 (*C. yegresii*), GI: 302884187 (*N. haematococca*), GI: 528062016 (*S. octosporus*), GI: 225556475 (*A. jellcapsulatus*), GI: 407920054 (*M. phaseolina*), GI: 501307230 (*P. hubeiensis*), GI: 521584086 (*P.flocculosa*), GI: 573065280 (*P. fici*), GI: 557998249 (*P. brasiliensis*), GI: 440468906 (*M. oryzae*), GI: 343428447 (*S. reilianum*), GI: 573029754 (*P. aphidis*), GI: 443899388 (*P. antarctica*), GI: 521722925 (*Gloeophyllum trabeum*), GI: 595781246 (*Fomitiporia mediterranea*), GI: 597992433 (*Dichomitus squalens*), GI: 336369088 (*Serpula lacrymans*), GI: 599122090 (*Punctularia strigosozonata*), GI: 618806649 (*Stereum hirsutum*), GI: 392588600 (*Coniophora puteana*), GI: 554914259 (*Moniliophthora roreri*), GI: 353235156 (*Piriformospora indica*), GI: 590011739 (*Capronia epimyces*) GI: 330906269 (*Pyrenophora teres*), GI:

(*Setosphaeria turcica*), GI: 477525551 (*Colletotrichum orbiculare*), GI: 599397707 (*Phanerochaete carnosae*), GI: 575060964 (*Heterobasidium irregulare*), GI: 597992433 (*Dichomitus squalens*), GI: 302683160 (*Schizophyllum commune*), GI: 449544940 (*Ceriporiopsis subvermispora*), GI: 636625831 (*Trametes versicolor*), GI: 170109364 (*Laccaria bicolor*), GI: 299738341 (*Coprinopsis cinerea okayama*), GI: 597994313 (*Agaricus bisporus*), GI: 598048335 (*Auricularia delicata*), GI: 326499876 (*Hordeum vulgare*), GI: 125551859 (*Oryza sativa*), GI: 502136834 (*Cicerarietinum*), GI: 302796270 (*Selaginella moellendorffii*), GI: 147819656 (*Vitis vinifera*), GI: 567886708 (*Citrus clementina*), GI: 565391207 (*Solanum tuberosum*).

6.7.3 Modelos estructurales

La estructura tridimensional de PhU (PhU_{UraA}) modelada por homología en base a la estructura cristalográfica de la proteína UraA (transportador de uracilo de *E. coli*, PDB ID: 5xls, (Lu et al., 2011). El alineamiento entre los transportadores PhU y UraA fue realizado en primera instancia con HHblits (Remmert et al., 2012) y posteriormente fue corregido manualmente de manera de evitar la ruptura de hélices (especialmente en la zonas transmembranas) al añadir inserciones entre los alineamientos. La estructura secundaria de UraA fue calculada a partir de la estructura tridimensional (PDB ID: 5xls; resolución cristalográfica 2.78 Å)(Lu et al., 2011) utilizando el software DSSP (Kabsch & Sander, 1983; Touw et al., 2015). Las regiones transmembranas de UraA se asignaron a partir de la base de datos UniProt. La estructura secundaria de PhU fue predicha con el algoritmo de PsiPred (Jones, 1999).

La estructura tridimensional de PhZ utilizada para la selección de residuos candidatos a mutagenizar fue modelada por homología en base a la estructura cristalográfica de la proteína UapA (PDB5i6c, resolución cristalográfica 3.7 Å, Alguel et al., 2016). Las secuencias de PhZ y UapA, fueron alineados con Aligme (Khafizov, 2014; Stamm et al., 2013; Khafizov, 2011) y luego este alineamiento fue usado para generar 2000 modelos de homología con el programa Modeller (Šali & Blundell, 1993). El 10% de los modelos que mejor se ajustaron a las restricciones espaciales del programa Modeller (en términos de la función de puntaje de Modeller) fueron luego ordenados según la función de ProQM (Ray et al., 2010), especialmente diseñada para proteínas de membrana. Este puntaje adopta valores desde 0 a 1, siendo las estructuras con valores cercanos a 1 aquellas más

parecidas a proteínas de membrana. Como el valor de este puntaje depende también de las proteínas utilizadas para entrenarlo, se calculó el puntaje de ProQM para UapA como referencia. Para la estructura cristalográfica se obtuvo un valor de 0.71 y para los modelos analizados de PhZ se obtuvieron valores desde 0.60 a 0.65 (razonable para ser una proteína de membrana). Ambos modelos fueron realizados por la Dra. Vanessa Loene (NIDS-NIH, USA) en el marco del proyecto FCE “Relacionando estructura-función de transportadores *AzgA-like* mediante modelado y análisis mutacional *in vivo*”. (Responsable: Mariana Barraco).

La estructura cristalina del transportador UapA (PDB5i6c, resolución cristalográfica 3.7 Å, Alguet et al., 2016) se utilizó como template para realizar el modelado por homología que dio como resultado la estructura tridimensional de PhZ (final) y PhU^{UapA}. El *template* seleccionado, corresponde la estructura homodimérica en conformación ocluida que mira hacia afuera, para el modelo se utilizó la estructura monomérica. La búsqueda del *template* más adecuado se realizó mediante la base de datos del SWISS-PROT. Para PhU se seleccionó UapA y para PhZ dada la baja identidad se seleccionaron como candidatos todos aquellos que presentarán un valor de cobertura mayor a 0,6: UapA (PDB 5i6c), UraA (PDB 5xls), transportador murino (PDB 6rtc) y transportador de bicarbonato de cyanobacteria (PDB 6ki1). Para obtener la coincidencia más satisfactoria PhZ-UapA, PhU-UapA se realizaron alineamientos mediante cuatro algoritmos (BLAST, HHBLIST, ALIGNME y MODELER). Las regiones de PhZ G68-L85; Y222-N229 y F297-N312 fueron modelada *de novo* con MODELER 9.24 (Bowie & Eisenberg, 1994) debido a que estas regiones carecían de homología con UapA y las regiones N-terminal de PhZ hasta G35 y R493 hasta el extremo C-terminal no fueron consideradas en el modelo.

Con el alineamiento curado a mano, se generaron 2000 estructuras con MODELER 9.24 (Fiser & Šali, 2003). Se seleccionaron las 20 conformaciones con menor "energía interna" (puntuación DOPE en MODELER) y fueron analizadas mediante PROQM y QMEANBRANE para evaluar la similitud de los modelos como proteínas transmembrana (Melo & Sali, 2007; Studer et al., 2014). Se seleccionaron los 9 mejores modelos y se realizó el refinamiento de *loops* en función de la energía potencial de cada residuo y comparación con el *template*. Los modelos se realizaron teniendo en cuenta el estado de protonación de los aminoácidos a pH 6,8. Se seleccionó el modelo de menor energía potencial, el cual fue posteriormente refinado por dinámicas moleculares a temperatura y presión ambiente, ubicándose en una caja de solvente (agua TIP3P) en condiciones

fisiológicas durante 500 ns (AMBER18). Se utilizaron parámetros del campo de fuerza ff14SB-ILDN (Maier et al., 2015). Ambos modelos fueron realizados en colaboración con la Mag. Gabriela da Rosa y Pablo D. Dans (DCB, CENUR, Litoral Norte).

6.7.4 Análisis de variantes correlacionadas

El análisis de variantes correlacionadas de PhZ fue realizado en colaboración con Vanessa Loene Para ello se buscaron variantes correlacionadas de los residuos de PhZ en un alineamiento de múltiples secuencias. El alineamiento fue generado con HHblits (Remmert et al., 2012), con dos iteraciones para buscar secuencias homólogas, obteniéndose ~900 secuencias con un E-value de -10 . Las variantes correlacionadas fueron extraídas utilizando el algoritmo EVcouplings (Hopf et al., 2012; Marks et al., 2011)

6.7.5 Ensayos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*)

Para los ensayos de docking molecular se utilizó el programa Autodock tools (Morris et al., 2009). La estructura generada mediante el modelado por homología (PhU_{UpA} y PhZ final) fue cargada en Autodock tools, donde se agregaron los átomos de hidrógeno y se asignaron cargas parciales a los átomos de proteína. Las estructuras de las purinas utilizadas como ligandos (xantina, ácido úrico, hipoxantina y 8-azaguanina fueron obtenidas de la base de datos del Protein Data Bank. Estas estructuras también se cargaron al programa Autodock tools se añadieron las cargas parciales de sus átomos y para la definición de la rotación de sus enlaces (ningún enlace rotable). Una vez preparada la proteína y los ligandos, se centró una grilla cúbica de 20 Å en la cavidad visible entre el dominio núcleo y puerta. El *docking* se realizó utilizando el algoritmo genético de Lamarck. Entre numerosas conformaciones generadas, las diez mejores fueron analizadas y ordenadas en base al criterio de energía de interacción, y se visualizaron mediante los programas Pymol (Schrödinger, LLC) y LigPlot (Wallace et al., 1995).

7 Bibliografía

Bibliografía

- Abramson, J. (2003). Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. *Science*, *301*(5633), 610-615. <https://doi.org/10.1126/science.1088196>
- Abramson, J., Iwata, S., & Kaback, H. R. (2004). Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*, *21*(4), 227-236. <https://doi.org/10.1080/09687680410001716862>
- Alborés, S., Bustamante, M. J., Fraguas, L. F., & Cerdeiras, M. P. (2014). Proteins from *Punctularia atropurpurascens* with Biotechnological Applications. *Natural Resources*, *05*(15), 915-925. <https://doi.org/10.4236/nr.2014.515078>
- Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, *102*, 28-43. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.001>
- Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J., Lambrinidis, G., Capaldi, S., Scull, N. J., Craven, G., Iwata, S., Armstrong, A., Mikros, E., Diallinas, G., Cameron, A. D., & Byrne, B. (2016). Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nature Communications*, *7*(1), 11336. <https://doi.org/10.1038/ncomms11336>
- Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (2004). Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Molecular Microbiology*, *52*(1), 205-216. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03956.x>
- Amillis, S., Hamari, Z., Amillis, S., Hamari, Z., Roumelioti, K., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (2007). Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology*, *24*(3), 206-214. <https://doi.org/10.1080/09687860601070806>
- Amillis, S., Kostis, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E., & Diallinas, G. (2011). Mutational Analysis and Modeling Reveal Functionally Critical Residues in Transmembrane Segments 1 and 3 of the UapA Transporter. *Journal of Molecular Biology*, *411*(3), 567-580. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.024>
- Amillis, S., Koukaki, M., & Diallinas, G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology*, *313*(4), 765-774. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5087>
- Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., & Glatigny, A. (1999). The hxB gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Molecular Microbiology*, *31*(4), 1065-1073. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01242.x>
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans* nmrA gene involved in nitrogen metabolite repression. *Journal of Bacteriology*, *180*(7), 1973-1977. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1973-1977.1998>
- Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N., & Diallinas, G. (2001). Functional Characterization of a Maize Purine Transporter by Expression in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell*, *13*(4), 953. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.953>
- Arnold, D. B., & Gallo, G. (2014). Structure meets function: Actin filaments and myosin motors in the axon. *Journal of Neurochemistry*, *129*(2), 213-220. <https://doi.org/10.1111/jnc.12503>

Bibliografía

- Arst, H. N., & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 126(2), 111-141. <https://doi.org/10.1007/BF00330988>
- Aviram, N., & Schuldiner, M. (2017). Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(24), 4079-4085. <https://doi.org/10.1242/jcs.204396>
- Banks, G. R., Shelton, P. A., Kanuga, N., Holden, D. W., & Spanos, A. (1993). The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: Sequence and transcriptional regulation. *Gene*, 131(1), 69-78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90670-X)
- Barnett, J. A. (2008). A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites1. *Yeast*, 25(10), 689-731. <https://doi.org/10.1002/yea.1630>
- Barraco-Vega, M. (2014). *Caracterización de transportadores de Basidiomycotas mediante expresión heteróloga en Aspergillus nidulans* [Maestría-PEDECIBA]. UDELAR.
- Barraco-Vega, M., Romero, H., Richero, M., Cerdeiras, M. P., & Cecchetto, G. (2017). Functional characterization of two novel purine transporters from the Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene*, 601, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.033>
- Becuwe, M., & León, S. (2014). Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *ELife*, 3, e03307. <https://doi.org/10.7554/eLife.03307>
- Berger, H., Basheer, A., Böck, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altmann, F., & Strauss, J. (2008). Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Molecular Microbiology*, 69(6), 1385-1398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06359.x>
- Berger, H., Pachlinger, R., Morozov, I., Goller, S., Narendja, F., Caddick, M., & Strauss, J. (2006). The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Molecular Microbiology*, 59(2), 433-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04957.x>
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borgese, N. (2016). Getting membrane proteins on and off the shuttle bus between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Journal of Cell Science*, 129(8), 1537-1545. <https://doi.org/10.1242/jcs.183335>
- Bouris, V., Martzoukou, O., & Amillis, S. (2019). *Nutrient transporter translocation to the plasma membrane via a Golgi-independent unconventional route*. <https://doi.org/10.1101/540203>
- Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., & Drevet, C. (2004). The AzgA Purine Transporter of *Aspergillus nidulans*: CHARACTERIZATION OF A PROTEIN BELONGING TO A NEW PHYLOGENETIC CLUSTER*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3132-3141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308826200>
- Cecchetto, G., Richero, M., Oestreicher, N., Muro-Pastor, M. I., Pantano, S., & Scazzocchio, C. (2012). Mutations in the basic loop of the Zn binuclear cluster of the UaY transcriptional activator suppress mutations in the dimerisation domain.

Bibliografía

- Fungal Genetics and Biology*, 49(9), 731-743. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.009>
- Chen, S. (2012). Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments. *Toxins*, 4(10). <https://doi.org/10.3390/toxins4100913>
- Chiang, C.-F., Okou, D. T., Griffin, T. B., Verret, C. R., & Williams, M. N. V. (2001). Green Fluorescent Protein Rendered Susceptible to Proteolysis: Positions for Protease-Sensitive Insertions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(2), 229-235. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2537>
- Christianson, J. C., & Ye, Y. (2014). Cleaning up in the endoplasmic reticulum: Ubiquitin in charge. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4), 325-335. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2793>
- Chudzicka-Ormaniec, P., Macios, M., Koper, M., Weedall, G. D., Caddick, M. X., Weglenski, P., & Dzikowska, A. (2019). The role of the GATA transcription factor AreB in regulation of nitrogen and carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz066>
- Colas, C., Ung, P. M.-U., & Schlessinger, A. (2016). SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. *MedChemComm*, 7(6), 1069-1081. PubMed. <https://doi.org/10.1039/C6MD00005C>
- Conlon, H., Zadra, I., Haas, H., Arst, H. N., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2001). The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene *areB* encodes at least three proteins and features three classes of mutation. *Molecular Microbiology*, 40(2), 361-375. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02399.x>
- Crapeau, M., Merhi, A., & André, B. (2014). Stress Conditions Promote Yeast Gap1 Permease Ubiquitylation and Down-regulation via the Arrestin-like Bul and Aly Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22103-22116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582320>
- Cultrone, A., Domínguez, Y. R., Drevet, C., Scazzocchio, C., & Fernández-Martín, R. (2007). The tightly regulated promoter of the *xanA* gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron: A fungal helitron includes a regulated promoter. *Molecular Microbiology*, 63(6), 1577-1587. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05609.x>
- Darlington, A. J., & Scazzocchio, C. (1967). Use of Analogues and the Substrate-Sensitivity of Mutants in Analysis of Purine Uptake and Breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 93(3), 937.
- Dawicki-McKenna, J. M., Goldman, Y. E., & Ostap, E. M. (2012). Sites of Glucose Transporter-4 Vesicle Fusion with the Plasma Membrane Correlate Spatially with Microtubules. *PLoS ONE*, 7(8), e43662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043662>
- Desai, S. A. (2012). Ion and nutrient uptake by malaria parasite-infected erythrocytes. *Cellular Microbiology*, 14(7), 1003-1009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01790.x>
- Diallinas. (2008a). *Aspergillus* transporters. En *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods* (Gustavo H. Goldman, Stephen A. Osmani, pp. 301-320). CRC Press.
- Diallinas. (2008b). BIOCHEMISTRY: An Almost-Complete Movie. *Science*, 322(5908), 1644-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1168107>
- Diallinas. (2014). Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00207>

Bibliografía

- Diallinas, G. (2016). Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. *Trends in Genetics*, 32(9), 576-590. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.003>
- Diallinas, G., & Gournas, C. (2008). The ubiquitous Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems. *Channels*, 2(5), 363-372. <https://doi.org/10.4161/chan.2.5.6902>
- Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., & Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *The EMBO Journal*, 17(14), 3827-3837. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3827>
- Dimou, S., Martzoukou, O., Dionysopoulou, M., Bouris, V., Amillis, S., & Diallinas, G. (2020). Translocation of nutrient transporters to cell membrane via Golgi bypass in *Aspergillus nidulans*. *EMBO Reports*, 21(7). <https://doi.org/10.15252/embr.201949929>
- Dourron, J. (2017). *Análisis Mutacional del Transportador PhU de <Phanerochaete chrysosporium> Tesina de Grado para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. Tutores: Glanna Cecchetto y Mariana Barraco*. Facultad de Química-Facultad de Ciencias UdelaR.
- Downes, D. J., Davis, M. A., Wong, K. H., Kreutzberger, S. D., Hynes, M. J., & Todd, R. B. (2014). Dual DNA binding and coactivator functions of *Aspergillus nidulans* TamA, a Zn(II)2Cys6 transcription factor. *Molecular Microbiology*, 92(6), 1198-1211. <https://doi.org/10.1111/mmi.12620>
- Drew, D., & Boudker, O. (2016). Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 543-572. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014520>
- Dupré, S., Urban-Grimal, D., & Haguener-Tsapis, R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695(1-3), 89-111. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.024>
- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherzyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F. O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., de Vries, R. P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., ... Watkinson, S. C. (2011). The Plant Cell Wall-Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. *Science*, 333(6043), 762. <https://doi.org/10.1126/science.1205411>
- Eising, S., Thiele, L., & Fröhlich, F. (2019). A systematic approach to identify recycling endocytic cargo depending on the GARP complex. *ELife*, 8, e42837. <https://doi.org/10.7554/eLife.42837>
- Evangelinos, M., Martzoukou, O., Chorozián, K., Amillis, S., & Diallinas, G. (2016). BsdABsd2-dependent vacuolar turnover of a misfolded version of the UapA transporter along the secretory pathway: Prominent role of selective autophagy. *Molecular Microbiology*, 100(5), 893-911. <https://doi.org/10.1111/mmi.13358>
- Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D. L., & Friant, S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/ijms16011509>
- Fiser, A., & Šali, A. (2003). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. En *Methods in Enzymology* (Vol. 374, pp. 461-491). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8)
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otiálar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A.,

Bibliografia

- Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., ... Hibbett, D. S. (2012). The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science*, 336(6089), 1715. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Foley, K., Boguslavsky, S., & Klip, A. (2011). Endocytosis, Recycling, and Regulated Exocytosis of Glucose Transporter 4. *Biochemistry*, 50(15), 3048-3061. <https://doi.org/10.1021/bi2000356>
- Foot, N., Henshall, T., & Kumar, S. (2016). Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiological Reviews*, 97(1), 253-281. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2016>
- Forrest, L. R., Krämer, R., & Ziegler, C. (2011). The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(2), 167-188. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.014>
- Forrest, L. R., & Rudnick, G. (2009). The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters. *Physiology*, 24(6), 377-386. <https://doi.org/10.1152/physiol.00030.2009>
- Frillingos, S. (2012). Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(3), 250-272. PubMed.
- Fujita, S., Sato, D., Kasai, H., Ohashi, M., Tsukue, S., Takekoshi, Y., Gomi, K., & Shintani, T. (2018). The C-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-responding degron recognized by the α -arrestin Rod1. *Journal of Biological Chemistry*, 293(28), 10926-10936. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001062>
- Gavriil, E.-S., Dimitrakis, S., Papadaki, G., Balaska, S., Lambrinidis, G., Lougiakis, N., Marakos, P., Diallinas, G., Pouli, N., & Mikros, E. (2018). Structure-activity relationships in fungal nucleobases transporters as dissected by the inhibitory effects of novel purine analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.038>
- Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E., & Frillingos, S. (2010). Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease: ASN-325 BINDS AND ALA-323 SENSES SUBSTRATE*., *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19422-19433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120543>
- Glatigny, A., & Scazzocchio, C. (1995). Cloning and Molecular Characterization of hxA, the Gene Coding for the Xanthine Dehydrogenase (Purine Hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*(*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3534-3550. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3534>
- Gouaux, E. (2005). Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps. *Science*, 310(5753), 1461-1465. <https://doi.org/10.1126/science.1113666>
- Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S., & Diallinas, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Molecular Membrane Biology*, 22(3), 263-275. <https://doi.org/10.1080/09687860500093016>
- Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S., & Diallinas, G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(4), 459-472. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.001>

Bibliografia

- Goudela, S., Tsilivi, H., & Diallinas, G. (2006). Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Molecular Membrane Biology*, 23(4), 291-303. <https://doi.org/10.1080/09687860600685109>
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A., & Diallinas, G. (2010). Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Molecular Microbiology*, 75(1), 246-260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06997.x>
- Gournas, C., Evangelidis, T., Athanasopoulos, A., Mikros, E., & Sophianopoulou, V. (2015). The *Aspergillus nidulans* Proline Permease as a Model for Understanding the Factors Determining Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6141-6155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612069>
- Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallinas, G., & Scazzocchio, C. (2011). Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(8), 840-848. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.03.004>
- Gournas, C., Papageorgiou, I., & Diallinas, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Molecular BioSystems*, 4(5), 404-416. <https://doi.org/10.1039/B719777B>
- Gournas, C., Prévost, M., Krammer, E.-M., & André, B. (2016). Function and Regulation of Fungal Amino Acid Transporters: Insights from Predicted Structure. En J. Ramos, H. Sychrová, & M. Kschischo (Eds.), *Yeast Membrane Transport* (Vol. 892, pp. 69-106). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_4
- Gournas, C., Saliba, É., Krammer, E.-M., Barthelemy, C., Prévost, M., & André, B. (2017). Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an α -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 28(21), 2819-2832. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-02-0104>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D699-D704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Guiney, E. L., Klecker, T., & Emr, S. D. (2016). Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Molecular Biology of the Cell*, 27(25), 4043-4054. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-08-0570>
- Gumy, L. F., & Hoogenraad, C. C. (2018). Local mechanisms regulating selective cargo entry and long-range trafficking in axons. *Cellular Neuroscience*, 51, 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.007>
- Guo, Y., Yang, F., & Tang, X. (2017). An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells. En L. Jiang (Ed.), *Plant Protein Secretion* (Vol. 1662, pp. 1-17). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7262-3_1

Bibliografía

- Hernández-González, M., Bravo-Plaza, I., Pinar, M., de los Ríos, V., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2018). Endocytic recycling via the TGN underlies the polarized hyphal mode of life. *PLOS Genetics*, *14*(4), e1007291. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007291>
- Hesse, D., Hommel, A., Jaschke, A., Moser, M., Bernhardt, U., Zahn, C., Kluge, R., Wittschen, P., Gruber, A. D., Al-Hasani, H., Joost, H.-G., & Schürmann, A. (2010). Altered GLUT4 trafficking in adipocytes in the absence of the GTPase Arfrp1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(4), 896-903. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.059>
- Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *19*(1), 141-172. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617>
- Hopf, T., Colwell, L., Sheridan, R., Rost, B., Sander, C., & Marks, D. (2012). Three-Dimensional Structures of Membrane Proteins from Genomic Sequencing. *Cell*, *149*, 1607-1621. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.012>
- Horst, R. J., Zeh, C., Saur, A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., & Voll, L. M. (2012). The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryotic Cell*, *11*(3), 368-380. PubMed. <https://doi.org/10.1128/EC.05191-11>
- Huang, Y. (2003). Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. *Science*, *301*(5633), 616-620. <https://doi.org/10.1126/science.1087619>
- Hunter, C. C., Siebert, K. S., Downes, D. J., Wong, K. H., Kreutzberger, S. D., Fraser, J. A., Clarke, D. F., Hynes, M. J., Davis, M. A., & Todd, R. B. (2014). Multiple nuclear localization signals mediate nuclear localization of the GATA transcription factor AreA. *Eukaryotic Cell*, *13*(4), 527-538. <https://doi.org/10.1128/EC.00040-14>
- Iriarte, A., Sanguinetti, M., Fernández-Calero, T., Naya, H., Ramón, A., & Musto, H. (2012). Translational selection on codon usage in the genus *Aspergillus*. *Gene*, *506*(1), 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.027>
- Ishii, T. M., Zerr, P., Xia, X.-M., Bond, C. T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1998). [4] Site-directed mutagenesis. En *Methods in Enzymology* (Vol. 293, pp. 53-71). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)93007-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)93007-5)
- Ito, Y., Uemura, T., Shoda, K., Fujimoto, M., Ueda, T., & Nakano, A. (2012). Cis-Golgi proteins accumulate near the ER exit sites and act as the scaffold for Golgi regeneration after brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(16), 3203-3214. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-01-0034>
- Jain, S., Sutchu, S., Rosa, P. A., Byram, R., & Jewett, M. W. (2012). *Borrelia burgdorferi* Harbors a Transport System Essential for Purine Salvage and Mammalian Infection. *Infection and Immunity*, *80*(9), 3086-3093. <https://doi.org/10.1128/IAI.00514-12>
- Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frendo-Cumbo, S., Bilan, P. J., & Klip, A. (2017). Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(8), 597-611. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.002>
- Jargeat, P., Gay, G., Debaud, J.-C., & Marmeisse, R. (2000). Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. *Molecular and General Genetics MGG*, *263*(6), 948-956. <https://doi.org/10.1007/PL00008695>

Bibliografía

- Jargeat, P., Rekangalt, D., Verner, M.-C., Gay, G., Debaud, J.-C., Marmeisse, R., & Fraissinet-Tachet, L. (2003). Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Current Genetics*, *43*(3), 199-205. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0387-2>
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 Edited by G. Von Heijne. *Journal of Molecular Biology*, *292*(2), 195-202. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>
- Juanes, M. A., Martínez-Garay, C. A., Igual, J. C., & Bañó, M. C. (2010). Targeting and membrane insertion into the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1. *FEMS Yeast Research*, *10*(6), 639-647. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00653.x>
- Jund, R., WEBER, E., & CHEVALLIER, M.-R. (1988). Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, *171*(1-2), 417-424. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13806.x>
- Kaback, H. R., Smirnova, I., Kasho, V., Nie, Y., & Zhou, Y. (2011). The Alternating Access Transport Mechanism in LacY. *The Journal of Membrane Biology*, *239*(1), 85-93. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9327-5>
- Kabsch, W., & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, *22*(12), 2577-2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>
- Käfer, E. (1958). An 8-Chromosome Map of *Aspergillus nidulans*. En M. Demerec (Ed.), *Advances in Genetics* (Vol. 9, pp. 105-145). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60161-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60161-3)
- Kappy, M. S., & Metzberg, R. L. (1967). Multiple Alterations in Metabolite Uptake in a Mutant of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, *94*(5), 1629.
- Karachaliou, M., Amillis, S., Evangelinos, M., Kokotos, A. C., Yalelis, V., & Diallinas, G. (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. *Molecular Microbiology*, *88*(2), 301-317. <https://doi.org/10.1111/mmi.12184>
- Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E., & Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning Analysis of the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in YgfO Permease of *Escherichia coli*: Gln-324 AND Asn-325 ARE ESSENTIAL, AND Ile-329-Val-339 FORM AN α -HELIX*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(52), 39881-39890. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605748200>
- Karena, E., & Frillingos, S. (2009). Role of Intramembrane Polar Residues in the YgfO Xanthine Permease: HIS-31 AND ASN-93 ARE CRUCIAL FOR AFFINITY AND SPECIFICITY, AND ASP-304 AND GLU-272 ARE IRREPLACEABLE. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(36), 24257-24268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030734>
- Karena, E., & Frillingos, S. (2011). The Role of Transmembrane Segment TM3 in the Xanthine Permease XanQ of *Escherichia coli**. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 39595-39605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299164>
- Kaur, J., & Bachhawat, A. K. (2009). A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Analytical Biochemistry*, *384*(2), 348-349. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.005>

Bibliografia

- Keener, J. M., & Babst, M. (2013). Quality Control and Substrate-Dependent Downregulation of the Nutrient Transporter Fur4: Fur4 Downregulation. *Traffic*, 14(4), 412-427. <https://doi.org/10.1111/tra.12039>
- Khafizov, K., Staritzbichler, R., Stamm, M., & Forrest, L. R. (2010). A Study of the Evolution of Inverted-Topology Repeats from LeuT-Fold Transporters Using AlignMe. *Biochemistry*, 49(50), 10702-10713. <https://doi.org/10.1021/bi101256x>
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). A «Silent» Polymorphism in the MDR 1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*, 315(5811), 525-528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>
- Kinghorn, J. R., & Pateman, J. A. (1975). Mutations which Affect Amino Acid Transport in *Aspergillus Nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 86(1), 174-184. <https://doi.org/10.1099/00221287-86-1-174>
- Klingenberg, M. (2007). Transport viewed as a catalytic process. *Transport and redox reactions from mitochondria to NADPH oxidase*, 89(9), 1042-1048. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.02.010>
- Klinkenberg, D., Long, K. R., Shome, K., Watkins, S. C., & Aridor, M. (2014). A cascade of ER exit site assembly that is regulated by p125A and lipid signals. *Journal of Cell Science*, 127(8), 1765-1778. <https://doi.org/10.1242/jcs.138784>
- Kmetzsch, L., Staats, C. C., Simon, E., Fonseca, F. L., Oliveira, D. L., Joffe, L. S., Rodrigues, J., Lourenço, R. F., Gomes, S. L., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2011). The GATA-type transcriptional activator Gat1 regulates nitrogen uptake and metabolism in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2), 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.07.011>
- Kosti, V., Lambrinidis, G., Myrianthopoulos, V., Diallinas, G., & Mikros, E. (2012). Identification of the Substrate Recognition and Transport Pathway in a Eukaryotic Member of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Family. *PLoS ONE*, 7(7), e41939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041939>
- Kosti, V., Papageorgiou, I., & Diallinas, G. (2010). Dynamic Elements at Both Cytoplasmically and Extracellularly Facing Sides of the UapA Transporter Selectively Control the Accessibility of Substrates to Their Translocation Pathway. *Journal of Molecular Biology*, 397(5), 1132-1143. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.037>
- Kotaka, M., Johnson, C., Lamb, H. K., Hawkins, A. R., Ren, J., & Stammers, D. K. (2008). Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.077>
- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., & Diallinas, G. (2005). The Nucleobase-ascorbate Transporter (NAT) Signature Motif in UapA Defines the Function of the Purine Translocation Pathway. *Journal of Molecular Biology*, 350(3), 499-513. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.076>
- Krishnamurthy, H., & Gouaux, E. (2012). X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature*, 481(7382), 469-474. <https://doi.org/10.1038/nature10737>
- Krol, K., Morozov, I. Y., Jones, M. G., Wyszomirski, T., Weglenski, P., Dzikowska, A., & Caddick, M. X. (2013). RrmA regulates the stability of specific transcripts in

Bibliografia

- response to both nitrogen source and oxidative stress. *Molecular Microbiology*, 89(5), 975-988. <https://doi.org/10.1111/mmi.12324>
- Kryptou, E., & Diallinas, G. (2014). Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 63, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.12.004>
- Kryptou, E., Evangelidis, T., Bobonis, J., Pittis, A. A., Gabaldón, T., Scazzocchio, C., Mikros, E., & Diallinas, G. (2015). Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Molecular Microbiology*, 96(5), 927-950. <https://doi.org/10.1111/mmi.12982>
- Kryptou, E., Kosti, V., Amillis, S., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., & Diallinas, G. (2012). Modeling, Substrate Docking, and Mutational Analysis Identify Residues Essential for the Function and Specificity of a Eukaryotic Purine-Cytosine NCS1 Transporter*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 36792-36803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400382>
- Kryptou, E., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E., & Diallinas, G. (2014). Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA: Structure-function relationships in AzgA. *Molecular Microbiology*, 93(1), 129-145. <https://doi.org/10.1111/mmi.12646>
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davies, R. W., & Arst, H. N. (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. *The EMBO Journal*, 9(5), 1355-1364.
- Kurokawa, K., Okamoto, M., & Nakano, A. (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature Communications*, 5(1), 3653. <https://doi.org/10.1038/ncomms4653>
- Laidlaw, K. M. E., & MacDonald, C. (2018). Endosomal trafficking of yeast membrane proteins. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1551-1558. <https://doi.org/10.1042/BST20180258>
- Lamb, H. K., Ren, J., Park, A., Johnson, C., Leslie, K., Cocklin, S., Thompson, P., Mee, C., Cooper, A., Stammers, D. K., & Hawkins, A. R. (2004). Modulation of the ligand binding properties of the transcription repressor NmrA by GATA-containing DNA and site-directed mutagenesis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 13(12), 3127-3138. <https://doi.org/10.1110/ps.04958904>
- Lee, I. R., Lim, J. W. C., Ormerod, K. L., Morrow, C. A., & Fraser, J. A. (2012). Characterization of an Nmr Homolog That Modulates GATA Factor-Mediated Nitrogen Metabolite Repression in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 7(3), e32585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032585>
- Lee, Ni, M., Li, W., Shertz, C., & Heitman, J. (2010). The Evolution of Sex: A Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 298-340. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-10>
- Leung, J., Cameron, A. D., Diallinas, G., & Byrne, B. (2013). Stabilizing the heterologously expressed uric acid-xanthine transporter UapA from the lower eukaryote *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology*, 30(1), 32-42. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.690572>
- Leung, J., Karachaliou, M., Alves, C., Diallinas, G., & Byrne, B. (2010). Expression and purification of a functional uric acid-xanthine transporter (UapA). *Protein Expression and Purification*, 72(1), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.02.002>

Bibliografia

- Lewis, C. M., & Fincham, J. R. S. (1970). Regulation of Nitrate Reductase in the Basidiomycete *Ustilago maydis*. *Journal of Bacteriology*, *103*(1), 55-61. <https://doi.org/10.1128/JB.103.1.55-61.1970>
- Lewis, N. J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H. M., & Scazzocchio, C. (1978). The Genetic Control of the Molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans* IV. A Comparison between Purine Hydroxylase I and II. *European Journal of Biochemistry*, *91*(1), 311-316. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb20967.x>
- Liu, J.-J., Sturrock, R. N., Sniezko, R. A., Williams, H., Benton, R., & Zamany, A. (2015). Transcriptome analysis of the white pine blister rust pathogen *Cronartium ribicola*: De novo assembly, expression profiling, and identification of candidate effectors. *BMC Genomics*, *16*(1), 678. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1861-1>
- Liu, Y. (2020). A code within the genetic code: Codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *18*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00642-6>
- Lu, Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J., & Yan, N. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, *472*(7342), 243-246. <https://doi.org/10.1038/nature09885>
- Lu, M.-Y. J., Fan, W.-L., Wang, W.-F., Chen, T., Tang, Y.-C., Chu, F.-H., Chang, T.-T., Wang, S.-Y., Li, M., Chen, Y.-H., Lin, Z.-S., Yang, K.-J., Chen, S.-M., Teng, Y.-C., Lin, Y.-L., Shaw, J.-F., Wang, T.-F., & Li, W.-H. (2014). Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(44), E4743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417570111>
- Lucic, E., Fourrey, C., Kohler, A., Martin, F., Chalot, M., & Brun-Jacob, A. (2008). A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, *180*(2), 343-364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02580.x>
- MacDonald, C., & Piper, R. C. (2017). Genetic dissection of early endosomal recycling highlights a TORC1-independent role for Rag GTPases. *Journal of Cell Biology*, *216*(10), 3275-3290. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702177>
- Mackay, E. M., & Pateman, J. A. (1982). The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Genetics*, *20*(7-8), 763-776. <https://doi.org/10.1007/BF00483972>
- Madej, M. G., Soro, S. N., & Kaback, H. R. (2012). Apo-intermediate in the transport cycle of lactose permease (LacY). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(44), E2970-E2978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211183109>
- Madej, M. G., Sun, L., Yan, N., & Kaback, H. R. (2014). Functional architecture of MFS D-glucose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(7), E719-E727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400336111>
- Maier, J., Martinez, C., Kasavajala, K., Wickstrom, L., Hauser, K., & Simmerling, C. (2015). Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*, 3696-3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Mansfield, T. A., Schultes, N. P., & Mourad, G. S. (2009). AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, *583*(2), 481-486. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.048>
- Marks, D. S., Colwell, L. J., Sheridan, R., Hopf, T. A., Pagnani, A., Zecchina, R., & Sander, C. (2011). Protein 3D Structure Computed from Evolutionary Sequence Variation. *PLoS ONE*, *6*(12), e28766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028766>

Bibliografia

- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., & Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, *22*(6), 695-700. <https://doi.org/10.1038/nbt967>
- Martzoukou, O., Amillis, S., Zervakou, A., Christoforidis, S., & Diallinas, G. (2017). The AP-2 complex has a specialized clathrin-independent role in apical endocytosis and polar growth in fungi. *ELife*, *6*, e20083. <https://doi.org/10.7554/eLife.20083>
- Martzoukou, O., Diallinas, G., & Amillis, S. (2018). Secretory Vesicle Polar Sorting, Endosome Recycling and Cytoskeleton Organization Require the AP-1 Complex in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *209*(4), 1121-1138. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301240>
- Martzoukou, O., Karachaliou, M., Yalelis, V., Leung, J., Byrne, B., Amillis, S., & Diallinas, G. (2015). Oligomerization of the UapA Purine Transporter Is Critical for ER-Exit, Plasma Membrane Localization and Turnover. *Journal of Molecular Biology*, *427*(16), 2679-2696. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.05.021>
- Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(2), 121-132. <https://doi.org/10.1038/nrm1315>
- Melo, F., & Sali, A. (2007). Fold assessment for comparative protein structure modeling. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *16*(11), 2412-2426. PubMed. <https://doi.org/10.1110/ps.072895107>
- Merhi, A., & André, B. (2012). Internal Amino Acids Promote Gap1 Permease Ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-Dependent Control of the Bul Arrestin-Like Adaptors. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(22), 4510. <https://doi.org/10.1128/MCB.00463-12>
- Mermelekas, G., Georgopoulou, E., Kallis, A., Botou, M., Vlantos, V., & Frillingos, S. (2010). Cysteine-scanning Analysis of Helices TM8, TM9a, and TM9b and Intervening Loops in the YgfO Xanthine Permease: A CARBOXYL GROUP IS ESSENTIAL AT ASP-276*The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2 and Table S1. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(45), 35011-35020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170415>
- Mikros, E., & Diallinas, G. (2019). Tales of tails in transporters. *Open Biology*, *9*(6), 190083. <https://doi.org/10.1098/rsob.190083>
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003). Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell*, *114*(4), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00609-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00609-3)
- Mirza, O., Guan, L., Verner, G., Iwata, S., & Kaback, H. R. (2006). Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *The EMBO Journal*, *25*(6), 1177-1183. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601028>
- Mitchell, P. (1957). A General Theory of Membrane Transport From Studies of Bacteria. *Nature*, *180*(4577), 134-136. <https://doi.org/10.1038/180134a0>
- Moller, S., Croning, M. D. R., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, *17*(7), 646-653. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.7.646>
- Morin, E., Kohler, A., Baker, A. R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagye, L. G., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Brun, A., Aerts, A. L., Bailey, A. M., Billette, C., Coutinho, P. M., Deakin, G., Doddapaneni, H., Floudas, D., Grimwood, J., Hilden, K., Kues, U., ... Martin, F. (2012). Genome sequence of the button

- mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17501-17506. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206847109>
- Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2001). Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Molecular Microbiology*, 42(1), 269-277. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02636.x>
- Morozov, I. Y., Martinez, M. G., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2000). A defined sequence within the 3' UTR of the *areA* transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation. *Molecular Microbiology*, 37(5), 1248-1257. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02085.x>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. PubMed. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Munteanu, B., Braun, M., & Boonrod, K. (2012). Improvement of PCR reaction conditions for site-directed mutagenesis of big plasmids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(4), 244-247. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100180>
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419(6907), 587-593. <https://doi.org/10.1038/nature01050>
- Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F., & Scazzocchio, C. (1999). The GATA factor *AreA* is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter. *The EMBO Journal*, 18(6), 1584-1597. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.6.1584>
- Naftalin, R. J. (2010). Reassessment of Models of Facilitated Transport and Cotransport. *Journal of Membrane Biology*, 234(2), 75-112. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9228-7>
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2006). A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557-1566. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052563>
- Nikko, E., & Pelham, H. R. B. (2009). Arrestin-Mediated Endocytosis of Yeast Plasma Membrane Transporters. *Traffic*, 10(12), 1856-1867. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00990.x>
- Nyathi, Y., Wilkinson, B. M., & Pool, M. R. (2013). Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Functional and structural diversity of the endoplasmic reticulum*, 1833(11), 2392-2402. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.021>
- Oestreicher, N., & Scazzocchio, C. (1993). Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(31), 23382-23389.
- Oestreicher, N., Sealy-Lewis, H. M., & Scazzocchio, C. (1993). Characterisation, cloning and integrative properties of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 132(2), 185-192. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90194-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90194-8)
- Otsu, W., Kurooka, T., Otsuka, Y., Sato, K., & Inaba, M. (2013). A New Class of Endoplasmic Reticulum Export Signal $\Phi X\Phi X\Phi$ for Transmembrane Proteins and Its Selective Interaction with Sec24C*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), 18521-18532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443325>

Bibliografia

- Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Molecular Membrane Biology*, 23(4), 337-348. <https://doi.org/10.1080/09687860600738239>
- Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2007). Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6), 657-675. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00083.x>
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(7), 627-640. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.10.003>
- Papadaki, G. F., Lambrinidis, G., Zamanos, A., Mikros, E., & Diallinas, G. (2019). Cytosolic N- and C-Termini of the *Aspergillus nidulans* FurE Transporter Contain Distinct Elements that Regulate by Long-Range Effects Function and Specificity. *Journal of Molecular Biology*, 431(19), 3827-3844. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.013>
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2008). Specific Interdomain Synergy in the UapA Transporter Determines Its Unique Specificity for Uric Acid among NAT Carriers. *Journal of Molecular Biology*, 382(5), 1121-1135. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.005>
- Papakostas, K., Botou, M., & Frillingos, S. (2013a). Functional Identification of the Hypoxanthine/Guanine Transporters YjcD and YgfQ and the Adenine Transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 36827-36840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523340>
- Papakostas, K., Botou, M., & Frillingos, S. (2013b). Functional Identification of the Hypoxanthine/Guanine Transporters YjcD and YgfQ and the Adenine Transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 36827-36840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523340>
- Papakostas, K., & Frillingos, S. (2012). Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15684-15695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355818>
- Pateman, J. A., Kinghorn, J. R., & Dunn, E. (1974). Regulatory Aspects of -Glutamate Transport in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119(2), 534.
- Patlak, C. S. (1957). Contributions to the theory of active transport: II. The gate type non-carrier mechanism and generalizations concerning tracer flow, efficiency, and measurement of energy expenditure. *The bulletin of mathematical biophysics*, 19(3), 209-235. <https://doi.org/10.1007/BF02477764>
- Patterson, M. A., Bandyopadhyay, A., Devaraneni, P. K., Woodward, J., Rooney, L., Yang, Z., & Skach, W. R. (2015). The Ribosome-Sec61 Translocon Complex Forms a Cytosolically Restricted Environment for Early Polytropic Membrane Protein Folding. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28944-28952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672261>
- Peng, R., Grabowski, R., De Antoni, A., & Gallwitz, D. (1999). Specific interaction of the yeast *cis*-Golgi syntaxin Sed5p and the coat protein complex II component Sec24p of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3751. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3751>

Bibliografia

- Penmatsa, A., & Gouaux, E. (2014a). How LeuT shapes our understanding of the mechanisms of sodium-coupled neurotransmitter transporters. *The Journal of Physiology*, *592*(5), 863-869. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.259051>
- Penmatsa, A., & Gouaux, E. (2014b). How LeuT shapes our understanding of the mechanisms of sodium-coupled neurotransmitter transporters: Role of LeuT in understanding neurotransmitter transporters. *The Journal of Physiology*, *592*(5), 863-869. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.259051>
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., & Peñalva, M. A. (2013). Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement. *Autophagy*, *9*(7), 1024-1043. <https://doi.org/10.4161/auto.24483>
- Platt, A., Langdon, T., Arst, H. N., Kirk, D., Tollervey, D., Sanchez, J. M., & Caddick, M. X. (1996). Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor AREA and the 3' untranslated region of its mRNA. *The EMBO Journal*, *15*(11), 2791-2801.
- Polley, S. D., & Caddick, M. X. (1996). Molecular characterisation of meaB, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Letters*, *388*(2-3), 200-205. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00541-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00541-8)
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Chemmons, L. M., Macdonald, K. D., & Bufton, A. W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. En M. Demerec (Ed.), *Advances in Genetics* (Vol. 5, pp. 141-238). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60408-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60408-3)
- Preston, G. M., & Brodsky, J. L. (2017). The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochemical Journal*, *474*(4), 445-469. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160582>
- Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., & Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(2), 123-132. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, *27*(3), 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, *3*(3), 71-85.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallynas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N., & Scazzocchio, C. (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3974-3986. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3974>
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: Lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods*, *9*(2), 173-175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>
- Reyes, N., Ginter, C., & Boudker, O. (2009). Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*, *462*(7275), 880-885. <https://doi.org/10.1038/nature08616>
- Ribard, C., Rochet, M., Labedan, B., Daignan-Fornier, B., Alzari, P., Scazzocchio, C., & Oestreicher, N. (2003). Sub-families of α/β Barrel Enzymes: A New Adenine Deaminase Family. *Journal of Molecular Biology*, *334*(5), 1117-1131. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.005>

Bibliografia

- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276-277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E. A., Sun, H., LaButti, K. M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S. E., Pisabarro, A. G., Walton, J. D., ... Grigoriev, I. V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>
- Saier, M. H. (1999). Eukaryotic Transmembrane Solute Transport Systems. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cytology* (Vol. 190, pp. 61-136). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62146-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62146-4)
- Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779-815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Sato, K., & Nakano, A. (2007). Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*, 581(11), 2076-2082. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.091>
- Scazzocchio, C. (1994). The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation. *Progress in Industrial Microbiology*, 29, 221-257.
- Scazzocchio, C., & Darlington, A. J. (1968). The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 166(2), 557-568. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(68\)90243-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(68)90243-8)
- Scazzocchio, C., Sdrin, N., & Ong, G. (1982). Positive regulation in a eukaryote, a study of the uaY gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the uaY--oxpA cluster. *Genetics*, 100(2), 185-208.
- Shi, Y. (2013). Common Folds and Transport Mechanisms of Secondary Active Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 51-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130429>
- Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., Sharples, D., Sansom, M. S. P., Iwata, S., Henderson, P. J. F., & Cameron, A. D. (2010). Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1. *Science*, 328(5977), 470. <https://doi.org/10.1126/science.1186303>
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Cargo Proteins Facilitate the Formation of Transport Vesicles in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 29889-29894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404399200>
- Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 117(3), 201-221. <https://doi.org/10.1007/BF01868451>
- Simmons, K. J., Jackson, S. M., Brueckner, F., Patching, S. G., Beckstein, O., Ivanova, E., Geng, T., Weyand, S., Drew, D., Lanigan, J., Sharples, D. J., Sansom, M. S., Iwata, S., Fishwick, C. W., Johnson, A. P., Cameron, A. D., & Henderson, P. J. (2014). Molecular mechanism of ligand recognition by membrane transport protein, Mhp1. *The EMBO Journal*, 33(16), 1831-1844. <https://doi.org/10.15252/embj.201387557>

Bibliografia

- Skach, W. R. (2009). Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(6), 606-612. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1600>
- Small, A. J., Hynes, M. J., & Davis, M. A. (1999). The TamA protein fused to a DNA-binding domain can recruit AreA, the major nitrogen regulatory protein, to activate gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *153*(1), 95-105.
- Small, A. J., Todd, R. B., Zanker, M. C., Delimitrou, S., Hynes, M. J., & Davis, M. A. (2001). Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *265*(4), 636-646. <https://doi.org/10.1007/s004380100456>
- Smith-Unna, R., Bournnell, C., Patro, R., Hibberd, J., & Kelly, S. (2016). TransRate: Reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, *26*, gr.196469.115. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Solomon, P., Ipcho, S., Hane, J., Tan, K.-C., & Oliver, R. (2008). A quantitative PCR approach to determine gene copy number. *Fungal Genet. Rep.*, *55*. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1082>
- Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(9), 609-622. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>
- Springer, S., Malkus, P., Borchert, B., Wellbrock, U., Duden, R., & Schekman, R. (2014). Regulated Oligomerization Induces Uptake of a Membrane Protein into COPII Vesicles Independent of Its Cytosolic Tail. *Traffic*, *15*(5), 531-545. <https://doi.org/10.1111/tra.12157>
- Springer, S., & Schekman, R. (1998). Nucleation of COPII Vesicular Coat Complex by Endoplasmic Reticulum to Golgi Vesicle SNAREs. *Science*, *281*(5377), 698. <https://doi.org/10.1126/science.281.5377.698>
- Stamm, M., Staritzbichler, R., Khafizov, K., & Forrest, L. R. (2013). Alignment of Helical Membrane Protein Sequences Using AlignMe. *PLOS ONE*, *8*(3), e57731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057731>
- Stamm, M., Staritzbichler, R., Khafizov, K., & Forrest, L. R. (2014). AlignMe—A membrane protein sequence alignment web server. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W246-W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gku291>
- Studer, G., Biasini, M., & Schwede, T. (2014). Assessing the local structural quality of transmembrane protein models using statistical potentials (QMEANBrane). *Bioinformatics*, *30*(17), i505-i511. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu457>
- Suárez, T., de Queiroz, M. V., Oestreicher, N., & Scazzocchio, C. (1995). The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *14*(7), 1453-1467.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, *1*(6), 3111-3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
- Takazawa, K., Noguchi, T., Hosooka, T., Yoshioka, T., Tobimatsu, K., & Kasuga, M. (2008). Insulin-induced GLUT4 movements in C2C12 myoblasts: Evidence against a role of conventional kinesin motor proteins. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, *54*(1), E14-22.
- Talaia, G., Gournas, C., Saliba, E., Barata-Antunes, C., Casal, M., André, B., Diallinas, G., & Paiva, S. (2017). The α -Arrestin Bullp Mediates Lactate Transporter

Bibliografia

- Endocytosis in Response to Alkalinization and Distinct Physiological Signals. *Journal of Molecular Biology*, 429(23), 3678-3695. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.014>
- Tavoularis, S., Scazzocchio, C., & Sophianopoulou, V. (2001). Functional Expression and Cellular Localization of a Green Fluorescent Protein-Tagged Proline Transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 33(2), 115-125. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1280>
- Tazebay, U. H., Sophianopoulou, V., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (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. *Molecular Microbiology*, 24(1), 105-117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3201689.x>
- Thomas, S. L. Y., Bouyer, G., Cuff, A., Egée, S., Glogowska, E., & Ollivaux, C. (2011). Ion channels in human red blood cell membrane: Actors or relics? *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(4), 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.bcmb.2011.02.007>
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2-3), 205-221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)
- Todd, R. B., Fraser, J. A., Wong, K. H., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2005). Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1646-1653. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1646-1653.2005>
- Tollervey, D. W., & Arst, H. N. (1982). Domain-wide, locus-specific suppression of nitrogen metabolite repressed mutations in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 6(1), 79-85. <https://doi.org/10.1007/BF00397645>
- Tomás, M., Martínez-Alonso, E., Ballesta, J., & Martínez-Menárguez, J. A. (2010). Regulation of ER–Golgi Intermediate Compartment Tubulation and Mobility by COPI Coats, Motor Proteins and Microtubules. *Traffic*, 11(5), 616-625. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01047.x>
- Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T. A. H., Krieger, E., Joosten, R. P., & Vriend, G. (2015). A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D364-D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1028>
- Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C., & Rosa, A. L. (2000). Protein Expression and Subcellular Localization of the General Purine Transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 30(2), 105-113. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1197>
- Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., & Rosa, A. L. (2004). Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(1), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.003>
- Västermark, Å., & Saier, M. H. (2014). Evolutionary relationship between 5+5 and 7+7 inverted repeat folds within the amino acid-polyamine-organocation superfamily: Evolutionary Relationship of Inverted Repeat Folds. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(2), 336-346. <https://doi.org/10.1002/prot.24401>
- Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., & Diallinas, G. (2006). A Novel-type Substrate-selectivity Filter and ER-exit Determinants in the UapA Purine Transporter. *Journal of Molecular Biology*, 357(3), 808-819. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.070>

Bibliografia

- Vlanti, A., & Diallinas, G. (2008). The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Molecular Microbiology*, *68*(4), 959-977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06198.x>
- Voorhees, R. M., & Hegde, R. S. (2016). Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Current Opinion in Cell Biology*, *41*, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.009>
- Wagner, D., Schmeinck, A., Mos, M., Morozov, I. Y., Caddick, M. X., & Tudzynski, B. (2010). The bZIP transcription factor MeaB mediates nitrogen metabolite repression at specific loci. *Eukaryotic Cell*, *9*(10), 1588-1601. <https://doi.org/10.1128/EC.00146-10>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, *8*(2), 127-134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
- Wawrzyn, G. T., Quin, M. B., Choudhary, S., López-Gallego, F., & Schmidt-Dannert, C. (2012). Draft Genome of *Omphalotus olearius* Provides a Predictive Framework for Sesquiterpenoid Natural Product Biosynthesis in Basidiomycota. *Chemistry & Biology*, *19*(6), 772-783. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.012>
- Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M. R., & Jund, R. (1990). The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Molecular Microbiology*, *4*(4), 585-596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00627.x>
- Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E. P., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S. G., Hope, R. J., Norbertczak, H. T., Roach, P. C. J., Iwata, S., Henderson, P. J. F., & Cameron, A. D. (2008). Structure and Molecular Mechanism of a Nucleobase-Cation-Symport-1 Family Transporter. *Science*, *322*(5902), 709-713. <https://doi.org/10.1126/science.1164440>
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R., & Riezman, H. (2000). The F-Box Protein Rcy1p Is Involved in Endocytic Membrane Traffic and Recycling Out of an Early Endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, *149*(2), 397-410. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.397>
- Wong, K. H., Hynes, M. J., & Davis, M. A. (2008). Recent advances in nitrogen regulation: A comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, *7*(6), 917-925. <https://doi.org/10.1128/EC.00076-08>
- Wong, K. H., Hynes, M. J., Todd, R. B., & Davis, M. A. (2007). Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *66*(2), 534-551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05940.x>
- Wu, X., & Rapoport, T. A. (2018). Mechanistic insights into ER-associated protein degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, *53*, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.004>
- Wymelenberg, A. V., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., Grigoriev, I., Shapiro, H., Putnam, N., Belinky, P., Dosoretz, C., Gaskell, J., Kersten, P., & Cullen, D. (2006). Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genetics and Biology*, *43*(5), 343-356. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.003>

Bibliografia

- Wymelenberg, A. V., Sabat, G., Martinez, D., Rajangam, A. S., Teeri, T. T., Gaskell, J., Kersten, P. J., & Cullen, D. (2005). The Phanerochaete chrysosporium secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *Journal of Biotechnology*, *118*(1), 17-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.010>
- Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J., Yoshida, Y., Ohta, K., & Yuasa, H. (2010). Identification and Functional Characterization of the First Nucleobase Transporter in Mammals: IMPLICATION IN THE SPECIES DIFFERENCE IN THE INTESTINAL ABSORPTION MECHANISM OF NUCLEOBASES AND THEIR ANALOGS BETWEEN HIGHER PRIMATES AND OTHER MAMMALS*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(9), 6522-6531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032961>
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-Dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, *437*(7056), 215-223. <https://doi.org/10.1038/nature03978>
- Yap, H.-Y. Y., Chooi, Y.-H., Firdaus-Raih, M., Fung, S.-Y., Ng, S.-T., Tan, C.-S., & Tan, N.-H. (2014). The genome of the Tiger Milk mushroom, *Lignosus rhinocerotis*, provides insights into the genetic basis of its medicinal properties. *BMC Genomics*, *15*(1), 635. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-635>
- Yin, X., Yang, J., Xiao, F., Yang, Y., & Shen, H.-B. (2018). MemBrain: An Easy-to-Use Online Webserver for Transmembrane Protein Structure Prediction. *Nano-Micro Letters*, *10*(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s40820-017-0156-2>
- Zanetti, G., Pahuja, K. B., Studer, S., Shim, S., & Schekman, R. (2012). COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature Cell Biology*, *14*(1), 20-28. <https://doi.org/10.1038/ncb2390>
- Zhao, Y., MacGurn, J. A., Liu, M., & Emr, S. (2013). The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *ELife*, *2*, e00459. <https://doi.org/10.7554/eLife.00459>