



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# FACULTAD DE CIENCIAS



Tesina de grado para la obtención de título de:

## LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

*“¿Es capaz el dominio C-terminal de UreA de  
aumentar la endocitosis de AzgA?”*

Autor:

*Bach. Santiago Scalese*

Tutor:

*Dr. Manuel Sanguinetti*

Co-tutora:

*Dra. Ana Ramón*

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelAR

Marzo, 2025

# Contenido

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
2.1. MEMBRANAS CELULARES .....	2
2.2. TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EUCARIOTAS.....	5
2.3. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES.....	7
2.4. UBIQUITINACIÓN.....	8
2.5. ASPERGILLUS NIDULANS COMO MODELO EUCARIOTA PARA EL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES .....	12
2.5.1. <i>Presentación del organismo</i> .....	12
2.5.2. <i>Estudio de transportadores en A. nidulans</i> .....	14
2.5.3. <i>UreA</i> .....	16
2.6. ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	17
2.7. OBJETIVOS.....	22
2.7.1. <i>General</i> .....	22
2.7.2. <i>Específicos</i> .....	22
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
3.1. OBTENCIÓN DE LOS CASSETTES GÉNICOS PARA LA GENERACIÓN DE LAS QUIMERAS AZGA-Ct.UREA-GFP Y AZGA-Ct.UREA(M)-GFP 23	
3.2. TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA MV060. ....	28
3.2.1. <i>Ensayos de crecimiento en placa</i> .....	30
3.3. VERIFICACIÓN DE INTEGRACIÓN DEL CASSETTE GÉNICO EN EL LOCUS AZGA.....	32
3.4. SEGUIMIENTO SUBCELULAR DE LAS QUIMERAS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	34
3.5. DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE AZGA-Ct.UREA-GFP MEDIANTE WESTERN BLOT.....	35
3.6. NUEVA ESTRATEGIA PARA GENERAR EL CASSETTE SCA2M: MUTAGÉNESIS DIRIGIDA .....	37
<b>4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>40</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
5.1.1. <i>Genotipo y fenotipo de cepas utilizadas</i> .....	41
5.2. CONSTRUCCIONES GÉNICAS.....	42
5.2.1. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	42
5.2.2. <i>Primers utilizados para la construcción de los cassettes génicos</i> .....	42
5.2.3. <i>Mix PCR y programas de ciclado para la 1<sup>era</sup> ronda de PCR</i> .....	44
5.2.4. <i>Mix PCR y programas de ciclado para la 2<sup>da</sup> ronda de PCR</i> .....	45
5.2.5. <i>Mix PCR y programas de ciclado para verificación de integración del cassette en locus azgA</i> .....	46
5.2.6. <i>Mix PCR y programas de ciclado para verificar la presencia de RiboB-AF en locus azgA y de manera independiente</i> .....	46
5.2.7. <i>ADN genómicos utilizados como molde</i> .....	47
5.2.8. <i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i> .....	47
5.2.9. <i>Análisis electroforético de ácidos nucleicos</i> .....	48
5.2.10. <i>Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa</i> .....	48
5.2.11. <i>Medios de cultivos</i> .....	49
5.2.12. <i>Condiciones de cultivo</i> .....	52
5.3. TÉCNICAS EMPLEADAS EN A. NIDULANS .....	53
5.3.1. <i>Transformación en Aspergillus nidulans</i> .....	53
5.3.2. <i>Extracción y purificación de ADN genómico de A. nidulans</i> .....	55
5.3.3. <i>Microscopia de epifluorescencia</i> .....	56
5.3.4. <i>Western Blot</i> .....	57
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>66</b>

## ***Agradecimientos***

En primer lugar, quiero agradecer a la Sección Bioquímica que me concedió la posibilidad de realizar mi trabajo final de grado, abriéndome sus puertas y permitiéndome conocer gente excepcional. En particular quiero resaltar a dos grandes científicos, docentes, seres humanos: Ana y Manu. Agradecido eternamente por ser parte del final de mi recorrido como estudiante de grado y comienzo de posgrado. A todos mis compañeros/cómplices/psicólogos de la 313, seguramente sin ellos todo hubiese sido mucho más difícil.

Gracias Universidad de la República, por una nueva primera generación de egresados universitarios en mi familia.

Por último, pero no menos importante, eternas gracias a todos los que fueron parte en algún momento de este viaje, familia, amigos y compañeros.

***Palabras claves***

Homeostasis

Transportadores de membrana plasmática

Endocitosis

*Aspergillus nidulans*

UreA

AzgA

ArtA

HulA

Regulación postraducciona

## **Abreviaturas**

*PTM – proteínas transportadoras de membrana*

*RE – retículo endoplasmático*

*GFP – Green Fluorescent Protein*

*STM – segmentos transmembrana*

*WB – Western blot*

*r.p.m. – revoluciones por minuto*

*DMSO – Dimetilsulfóxido*

*ADN – Ácido desoxirribonucleico*

*ARN – Ácido ribonucleico*

*dNTPs – 2-Desoxinucleótidos 5-trifosfato*

*EDTA – Ácido etilendiamino-tetra-acético*

*Kb – Kilobases*

*MC – Medio completo*

*MM – Medio mínimo*

*pb – Pares de bases*

*PCR – Reacción en cadena de la ADN polimerasa*

*PEG – Polietilenglicol*

*MPM – Marcador de peso molecular*

*TE – Buffer Tris EDTA*

*TAE – Buffer Tris Acetato EDTA*

*UV – Ultravioleta*

*UTR – Región no traducida*

## 1. Resumen

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

Uno de los mecanismos más importantes de regulación comprende la remoción selectiva de transportadores de membrana, mediante un proceso de endocitosis que deriva en una posterior degradación. En este trabajo pretendemos aportar al conocimiento de los mecanismos que subyacen a este proceso, utilizando como modelo UreA, el transportador de alta afinidad por la urea de *Aspergillus nidulans*, el cuál es endocitado para su degradación en respuesta a la adición de amonio en el medio de cultivo (endocitosis mediada por amonio). El equipo de investigación en donde se llevó a cabo este trabajo identificó tanto elementos en *trans* (e.g., ubiquitin-ligasa Hula y un adaptador para esta, ArtA), como elementos en *cis* (lisinas candidatas a ser ubiquitinadas y un parche ácido de potencial interacción con ArtA) presentes en el dominio C-terminal del transportador, que están involucrados en su endocitosis. Con respecto al posible sitio de unión a la arrestina ArtA, no se puede descartar que la secuencia identificada pueda formar parte de un motivo tridimensional, que interactúe con otras partes de la molécula de UreA.

Dado que AzgA, el transportador de adenina/hipoxantina de *A. nidulans*, es prácticamente insensible a la endocitosis mediada por amonio, en este trabajo se buscó determinar si el añadido del dominio C-terminal de UreA es capaz de aumentar la endocitosis de AzgA en presencia de este estímulo endocítico. Mediante la generación, expresión funcional en *A. nidulans* y posterior análisis de la quimera AzgA-Ct.UreA-GFP, se logró responder afirmativamente a la pregunta que da lugar el título de esta tesina, aportando una nueva evidencia que respalda la importancia y funcionalidad de los extremos terminales citosólicos de los transportadores eucariotas.

## 2. Introducción

### 2.1. *Membranas celulares*

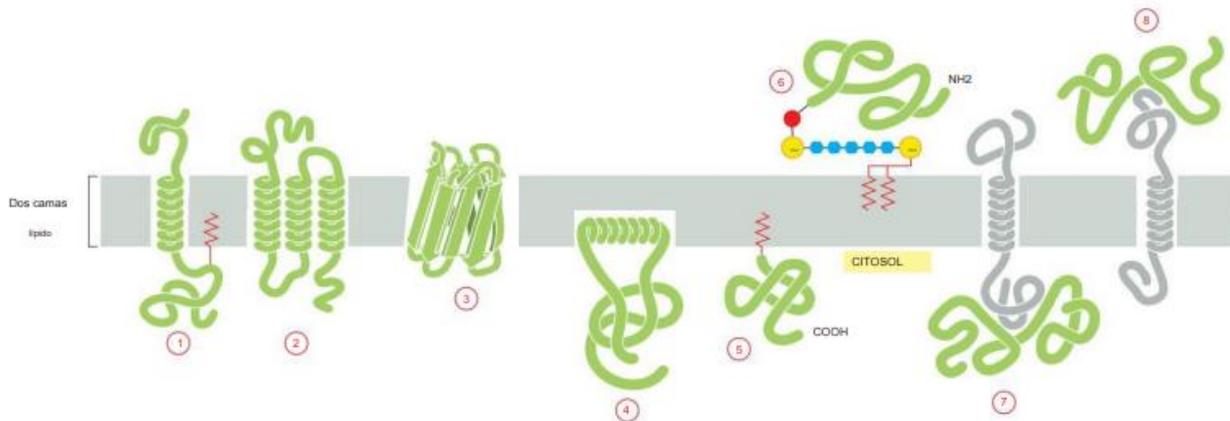
A nivel celular existen grandes barreras biológicas que logran delimitar los distintos ambientes. Estas barreras biológicas se conocen como membranas celulares, y logran establecer los propios límites de una célula, así como también compartimentos internos de la misma. Esta capacidad de separar ambientes, permiten que los distintos procesos bioquímicos a nivel celular puedan ocurrir en las condiciones adecuadas.

Las membranas celulares están compuestas por una gran variedad de lípidos, entre los cuales destacan los fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides, que constituyen sus principales componentes lipídicos. Estos se disponen en una bicapa lipídica de aproximadamente 10 nm de espesor, cuya organización es fundamental para mantener la estabilidad estructural y funcional de la célula. En términos generales, esta bicapa presenta asimetría en su composición lipídica, diferenciándose las caras interna y externa según los compartimentos o ambientes que delimitan (Bogdanov, 2023; Van Meer et al., 2008).

Además de los lípidos, otro componente esencial de las membranas celulares son las proteínas de membrana. Se estima que aproximadamente el 20 – 30 % de las proteínas codificadas por el genoma de todos los organismos corresponden a este tipo de proteínas, lo que resalta su importancia biológica. Estas cumplen diversas funciones, como proporcionar soporte estructural (proteínas de adhesión), transducir señales celulares (receptores celulares), facilitar la síntesis de ATP (proteínas de respiración celular presentes en la mitocondria) y transportar una gran variedad de sustratos a través de la membrana (Alberts et al., 2014). En conjunto, la composición proteica y lipídica de las membranas determina su identidad y funcionalidad en el contexto de la célula.

A diferencia de las proteínas citosólicas, las proteínas de membrana presentan regiones hidrofóbicas esenciales para su integración en los entornos lipídicos de las membranas celulares. Dependiendo del tipo de interacción con la membrana, se pueden encontrar: proteínas de anclaje a la membrana (unión covalente de un pequeño péptido

a los lípidos de membrana), proteínas de membrana que se insertan de manera parcial, interactuando con una sola capa de la bicapa lipídica y proteínas transmembrana, que logran atravesar completamente la bicapa lipídica una o más veces (Figura 1).



*Figura 1. Representación esquemática de las distintas formas e interacciones entre proteínas (representadas en verde) de membrana y la membrana celular (representada en gris). 1, 2 y 3 - indican proteínas transmembrana, atravesando completamente la membrana celular, e indicando las dos conformaciones principales, hélices  $\alpha$  y barriles  $\beta$ . 4- Interacción únicamente con una de las capas que forman parte de la bicapa lipídica. 1, 5 y 6 - indican proteínas con dominios de anclaje covalente (mostrados en rojo) insertados en la bicapa lipídica. 7 y 8 - muestran proteínas de asociación a la membrana, que interactúan mediante enlaces no covalentes con proteínas transmembrana. Figura tomada de (Alberts et al., 2014).*

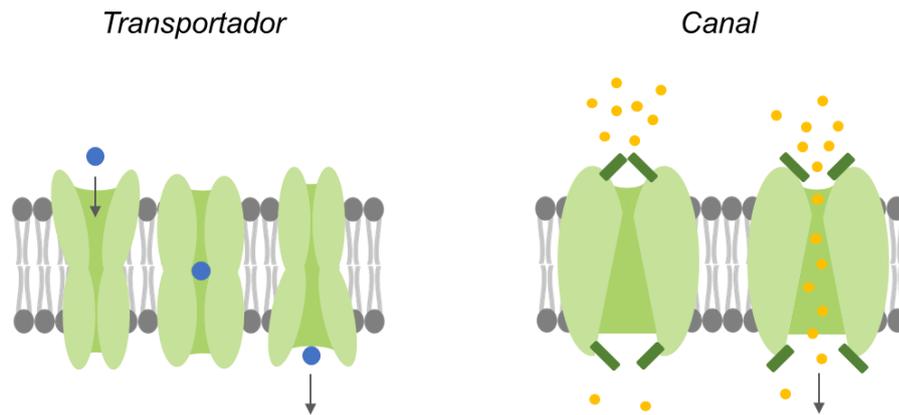
En particular, las proteínas transmembrana se caracterizan por poseer dos dominios hidrofílicos (generalmente uno a cada lado de la membrana) separados por polipéptidos apolares organizados principalmente en dos conformaciones: hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  formando barriles (barriles  $\beta$ ). Esta dualidad estructural, entre regiones lipofílicas e hidrofílicas, permite que las proteínas transmembrana desempeñen diversos roles, entre ellos: señalización celular, adhesión celular, comunicación intercelular, funciones enzimáticas y transporte de moléculas, esta última llevada a cabo por las proteínas transportadoras de membrana (PTM) (Pogozheva et al., 2014).

Las proteínas transportadoras de membrana desempeñan un papel fundamental en el transporte de iones, moléculas pequeñas y macromoléculas a través de todas las membranas celulares, pero en particular en la membrana plasmática. Su importancia

radica en su capacidad para regular el flujo de solutos, lo que influye directamente en procesos esenciales como la absorción de nutrientes, el metabolismo energético, la comunicación inter e intracelular, la eliminación de desechos y la regulación del volumen celular, entre otros (Pizzagalli et al., 2020), estableciendo un nexo entre los distintos compartimentos delimitados por las membranas biológicas. Diversos estudios han encontrado que un 5-15% de las proteínas codificadas de todos los genomas, corresponden a PTM, lo cual habla de su importancia biológica (Mikros & Diallinas, 2019).

A nivel sistémico, la función de las PTM impacta en la homeostasis del organismo, y la falla en su función se ha asociado con diversas patologías, incluyendo fibrosis quística, insuficiencia renal, cáncer y diabetes mellitus tipo 2, entre otras (El-Gebali et al., 2013; Mikros & Diallinas, 2019; Saha, 2020; Sano, 2023). Además, estas proteínas desempeñan un papel clave en la farmacocinética, ya que pueden influir en la biodisponibilidad y eficacia de ciertos fármacos, lo que las convierte en objetivos relevantes en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Zhang et al., 2021).

Dentro de las PTM, es importante distinguir conceptualmente entre transportadores y canales (Figura 2). Los transportadores son proteínas de membrana que contienen un único sitio de unión para el sustrato y actúan de manera similar a las enzimas, catalizando a través de cambios conformacionales el transporte de un sustrato a través de la membrana, ya sea a favor o en contra de su gradiente electroquímico. Por otra parte, los canales funcionan como compuertas que se abren o cierran, permitiendo un flujo continuo de solutos únicamente a favor de su gradiente electroquímico (Diallinas, 2014). A continuación, nos centraremos exclusivamente en los transportadores de membrana eucariotas.



*Figura 2. Mecanismo de transporte: transportadores vs canales. Cambios estructurales en los transportadores catalizan el transporte del soluto desde un lado al otro de la membrana. Los canales funcionan a través de la apertura y cierre de compuertas que permiten el flujo continuo de solutos en favor del gradiente electroquímico.*

## **2.2. Transportadores de membrana eucariotas**

Los transportadores se pueden clasificar según su mecanismo de transporte en uniportadores y cotransportadores. Los uniportadores transportan un único soluto por vez, mientras que los cotransportadores movilizan dos moléculas simultáneamente. Dentro de esta última categoría, se distinguen los simportadores, que transportan ambas moléculas en la misma dirección, y los antiportadores, que las movilizan en direcciones opuestas (Alberts et al., 2014) (Figura 3).

También se pueden clasificar a los transportadores en base al requerimiento energético del transporte. En este sentido, se identifican dos tipos principales de transporte: pasivo y activo. El transporte pasivo ocurre sin gasto energético, e implica el transporte de solutos a favor de su gradiente electroquímico; este tipo de transportadores se denominan facilitadores. En contraste, el transporte activo requiere un aporte de energía para movilizar los solutos en contra de su gradiente electroquímico, pudiendo subclasificarlos en transportadores activos primarios y secundarios (Yan, 2003). El transporte activo primario obtiene la energía directamente de la hidrólisis de ATP para impulsar el movimiento de los solutos. Un ejemplo característico es la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que mantiene el gradiente iónico esencial para la función celular al intercambiar

sodio y potasio a través de la membrana. Por otro lado, el transporte activo secundario aprovecha la energía almacenada en un gradiente electroquímico generalmente asociado a iones. En este caso, el movimiento de un soluto a favor de su gradiente impulsa el transporte de otro soluto en contra de su gradiente. Como ejemplo de este mecanismo se puede encontrar a la familia de simportadores de Na<sup>+</sup>/solute (*Sodium Solute Symporter*), encontrándose presentes en procariotas y eucariotas. Esta familia de simportadores utiliza el gradiente de sodio (en abundancia en el exterior celular) para facilitar la captación de azúcares, iones, vitaminas, compuestos nitrogenados, etc, en la célula (Jung, 2002; Saier, 2000; Wright et al., 2004).

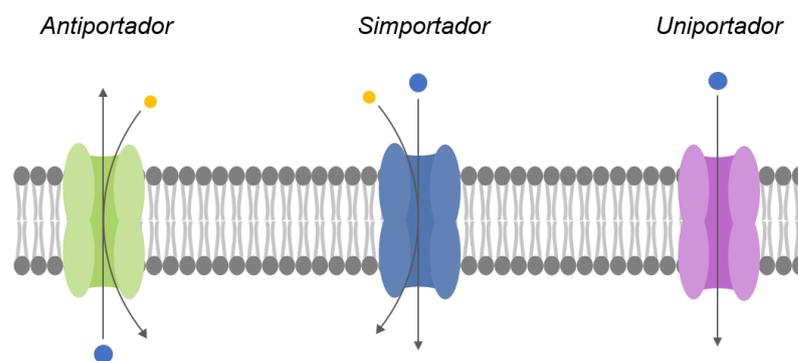
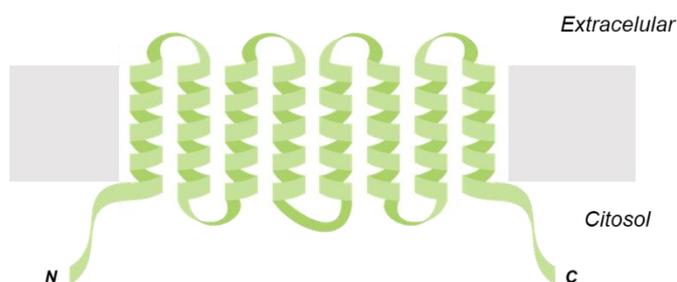


Figura 3. Representación esquemática de los distintos mecanismos de transporte. Los círculos representan solutos (azul: sustrato, amarillo: ión co-transportado) y las flechas indican el sentido en el que serán transportados.

Estructuralmente los transportadores activos secundarios se caracterizan por presentar de entre 10 a 14 segmentos transmembrana (STM)  $\alpha$ -helicoidales hidrofóbicos interconectados mediante bucles y dos extremos N y C terminales polares que usualmente, al menos uno de ellos, se encuentra orientado hacia el citosol (Mikros & Diallinas, 2019) (Figura 4). En cuanto al mecanismo de transporte general, este ocurre por cambios conformacionales reversibles que acontecen una vez se reconoce al sustrato. Estos cambios impulsan una topología particular de orientación “hacia adentro” y “hacia afuera” que permiten la translocación del sustrato. La evidencia bioquímica y estructural muestra que los STM albergan residuos de aminoácidos que interactúan con los sustratos o catalizan interacciones intrahelicoidales asociadas a la traslocación del sustrato. Además, los bucles hidrofílicos que unen los STM, también

presentan residuos aminoacídicos que puedan desempeñar un papel en el reconocimiento y el transporte del sustrato (Diallinas, 2014). Estos hallazgos han generado un marco de preguntas acerca de los roles que puedan estar cumpliendo los dominios C y N terminal hidrofílicos, particularmente en organismos eucariotas cuyos dominios, en general, son más largos que en procariotas (prácticamente inexistentes en algunos casos) (Mikros & Diallinas, 2019).



*Figura 4. Estructura de los transportadores de membrana. Segmentos transmembrana  $\alpha$ -helicoidales unidos mediante bucles y sus dos dominios hidrofílicos, los extremos o “colas” N y C terminales. La orientación de los extremos N y C hacia el citosol o la región extracelular puede variar dependiendo del transportador.*

### **2.3. Regulación de los transportadores**

Habiendo expuesto la importancia de los transportadores a nivel celular y fisiológico, es fundamental comprender cómo modulan sus funciones en respuesta a diversas señales internas y externas. Estas proteínas desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular, facilitando el movimiento de una amplia variedad de moléculas, desde iones y nutrientes hasta metabolitos esenciales. Sin embargo, la presencia y actividad de estos transportadores no es estática, sino que está sujeta a un control dinámico que asegura que su acción sea acorde a las necesidades metabólicas y al estado fisiológico de la célula (Chudzicka-Ormaniec et al., 2019).

La regulación de los transportadores implica una amplia variedad de mecanismos que operan a diferentes niveles y de manera simultánea. Los mecanismos básicos implican regulación a nivel de la expresión génica, de la síntesis proteica, el plegamiento y el transporte a las membranas específicas donde cumplirán sus funciones. Además de

estos mecanismos básicos, existen complejos procesos regulatorios que modulan la actividad y estabilidad de los transportadores a nivel postraducciona. Entre estos mecanismos se incluyen las modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la glicosilación y la ubiquitinación, que pueden alterar la conformación del transportador, la afinidad por su sustrato, su capacidad de interacción con otras proteínas o su estabilidad en la membrana plasmática (Czuba et al., 2018). Estas modificaciones no solo afectan la función de los transportadores, sino que también pueden influir en su distribución y localización subcelular, promoviendo su internalización, reciclaje o degradación (Lauwers et al., 2010; Risinger & Kaiser, 2008). En conjunto, estos mecanismos permiten lo que parece ser una regulación más precisa y adaptativa de los transportadores en respuesta a cambios en el entorno celular.

Existen numerosos modelos eucariotas en los que se ha avanzado significativamente en la comprensión de la regulación postraducciona, sus mecanismos y sus implicancias en la fisiología celular. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* se destacan como los modelos predominantes en este campo debido a su accesibilidad genética, facilidad de manipulación experimental y similitudes con organismos de mayor complejidad.

#### **2.4. Ubiquitinación**

Un proceso particularmente relevante en la regulación de la composición del repertorio de transportadores de membrana plasmática, es la degradación/reciclaje de los mismos. Esta regulación adquiere especial relevancia en contextos donde se requiere una respuesta rápida y dinámica que se acople a los repentinos cambios a los que puede estar expuesta una célula. Un modulador clave en este proceso es la ubiquitinación (Belgareh-Touzé et al., 2008; Lauwers et al., 2010; Risinger & Kaiser, 2008).

La ubiquitinación es el resultado final de tres reacciones enzimáticas secuenciales que tienen como resultado la adición covalente de un polipéptido de 76 aminoácidos denominado ubiquitina. Esto ocurre mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de la ubiquitina y un grupo amino de un

residuo específico de lisina (Komander, 2009). Es interesante el hecho de que la ubiquitinación puede ocurrir repetidas veces sobre sí misma, formando cadenas de ubiquitinas sobre una proteína blanco que refieren a un “código de ubiquitina”. Este código será interpretado por la maquinaria celular y otorgará un destino particular a la proteína blanco. Además, también podrá ocurrir la desubiquitinación con la participación de proteasas específicas (desubiquitininas), permitiendo que este proceso actúe como un interruptor regulador (Nagy & Dikic, 2010).

Las ubiquitin ligasas (E3) son enzimas esenciales en el sistema de ubiquitinación, ya que confieren especificidad al proceso de transferencia de ubiquitina a proteínas sustrato, regulando su estabilidad, función y localización celular. Existen dos grandes familias según su mecanismo de acción: RING (*Really Interesting New Gene*) y HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*). Las ligasas RING actúan como plataformas de interacción que facilitan la transferencia directa de ubiquitina desde la enzima conjugadora E2 al sustrato sin participación catalítica propia. Por otro lado, las ligasas HECT poseen un dominio catalítico característico que les permite aceptar la ubiquitina en un residuo de cisteína antes de transferirla al sustrato, otorgándoles un mayor control sobre la topología de las cadenas de ubiquitina formadas (Nagy & Dikic, 2010).

La ubiquitinación es un proceso fundamental en el tráfico intracelular de los transportadores de membrana. En general, la adición de ubiquitina redirige estos transportadores desde el aparato de Golgi o la membrana plasmática hacia los endosomas mediante tráfico vesicular, donde serán posteriormente clasificados por complejos proteicos para su reciclaje o su degradación en los lisosomas/vacuolas, dependiendo del contexto celular (MacGurn et al., 2012) (Figura 5). Sin embargo, para que esto pueda ocurrir, debe haber residuos de lisina accesibles a las ubiquitin ligasas. Es en este punto en donde se ha logrado encontrar una respuesta a los roles fundamentales que puedan estar cumpliendo los extremos hidrofílicos N y C terminal de los transportadores eucariotas.

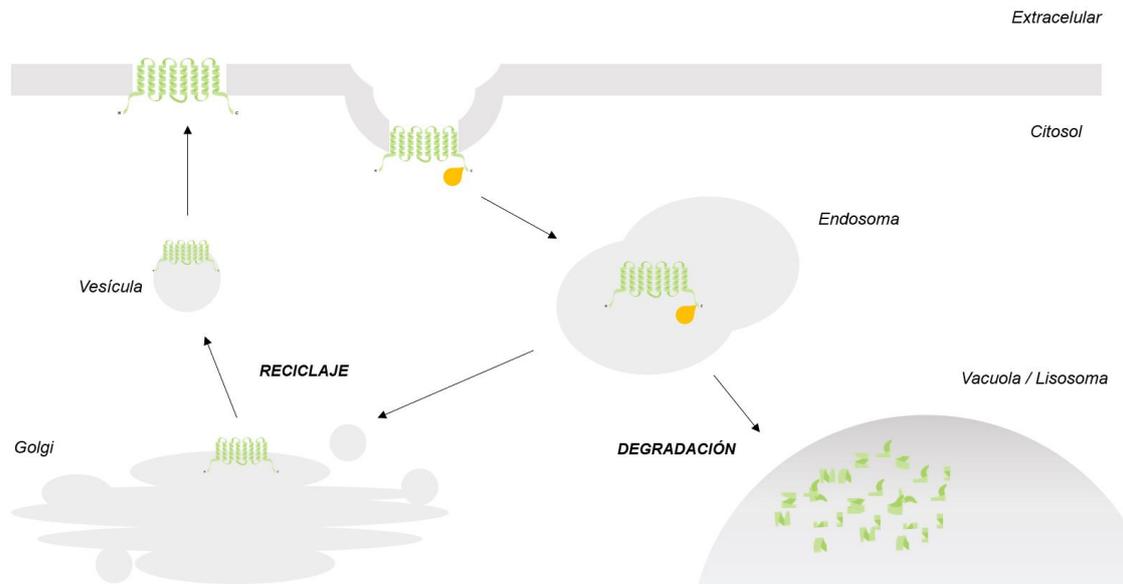


Figura 5. Tráfico intracelular de los transportadores. Los transportadores de membrana (indicados en verde) son internalizados por endocitosis posterior a su ubiquitinación (ubiquitina marcada en naranja). Las vesículas endocíticas se fusionarán con el endosoma, allí serán clasificados y enviados al Golgi para su reciclaje o a las vacuolas/lisosomas en donde serán degradados.

En hongos la ubiquitinación de los transportadores de membrana se lleva a cabo por una ubiquitin ligasa altamente conservada de la familia HECT de tipo Nedd4, identificada como Rsp5 o Hula en *S. cerevisiae* o *A. nidulans* respectivamente (Belgareh-Touzé et al., 2008; Gournas et al., 2010). La presencia de ortólogos de esta enzima en animales sugiere un alto grado de conservación evolutiva y resalta su importancia en los organismos eucariotas (Marín, 2018). Rsp5/Hula contiene motivos WW (repetido de Triptófano) capaces de reconocer motivos PPxY/LPxY (P: Prolina, Y: Tirosina, L: Leucina y x: aminoácido variable) localizados en los extremos citosólicos de sus proteínas blanco (Lin et al., 2008). La interacción de estos motivos, parece ser fundamental para la especificidad de las ubiquitin ligasas. Sin embargo, la diversidad de transportadores en la membrana plasmática y la ausencia de motivos PPxY/LPxY en algunos de estos, representa un desafío significativo para la célula.

Estudios en *S. cerevisiae* han encontrado miembros de una familia de proteínas tipo arrestina que actúan como adaptadores para el reclutamiento de Rsp5/Hula hacia transportadores de membrana a ser ubiquitinados. Estas proteínas se denominaron *arrestin-related trafficking adaptors* (ART) o  $\alpha$ -arrestinas (Lin et al., 2008). Se ha

demostrado que la ubiquitinación del transportador de manganeso Smf1 y de los transportadores de aminoácidos Can1, Lyp1 y Mup1 de *S. cerevisiae* está mediada por proteínas adaptadoras similares a las arrestinas (Nikko & Pelham, 2009). Asimismo, en *A. nidulans*, se obtuvieron resultados análogos para los transportadores de purinas UapA y FurE, en los cuales se identificó un motivo corto diacídico (E/DXEE) en el extremo C-terminal citosólico y próximo a lisinas blanco de ubiquitinación, que actuaría como sitio de unión de proteínas de tipo arrestina, siendo este esencial para la ubiquitinación y/o endocitosis (Karachaliou et al., 2013; Papadaki et al., 2019).

El modelo de interacción actualmente propuesto sugiere que cada  $\alpha$ -arrestina posee un dominio N-terminal característico (de tipo arrestina) junto con múltiples motivos PPxY en su extremo C-terminal. Estos motivos (similares a los presentes en los C-terminales de ciertos transportadores de membrana) se unen a los dominios WW de Rsp5/HulA, formando complejos Rsp5/HulA- $\alpha$ -arrestinas, los cuales permiten ubiquitinar de manera específica determinados transportadores de membrana (Figura 6) (Barata-Antunes et al., 2021).

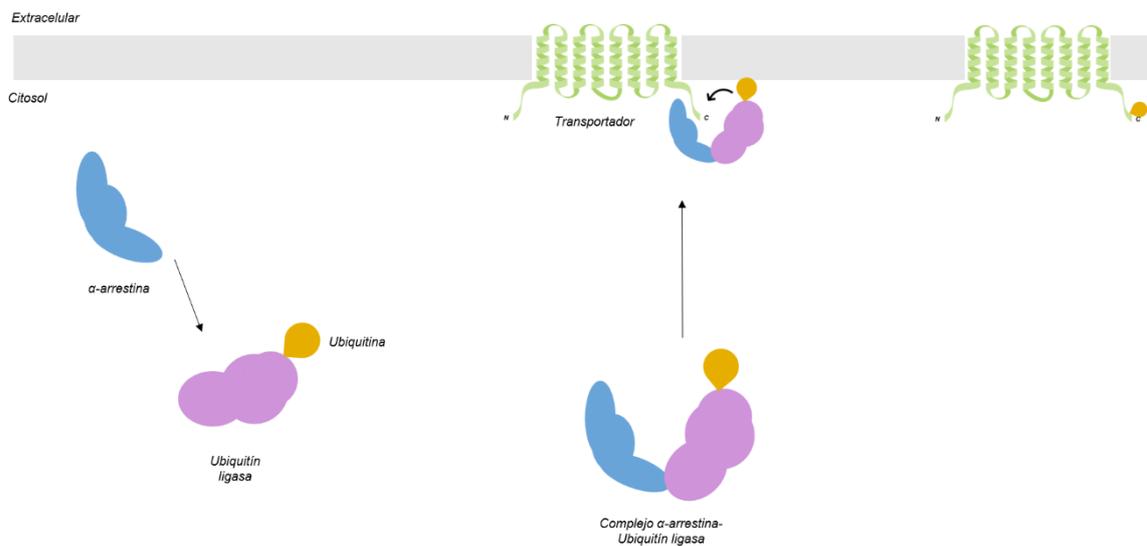


Figura 6. Representación esquemática del modelo de interacción propuesto. Las  $\alpha$ -arrestinas, mediante sus motivos PPxY, serán capaces de reconocer motivos WW presentes en las ubiquitin ligasas y reclutarlas hacia las proximidades de las Lys presentes en los dominios citosólicos de los transportadores para efectuar la ubiquitinación.

En este trabajo de investigación se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos que subyacen en la regulación negativa de los transportadores de membrana. Utilizando como modelo el transportador de alta afinidad por la urea de *A. nidulans*, UreA.

## **2.5. *Aspergillus nidulans* como modelo eucariota para el estudio de transportadores**

### *2.5.1. Presentación del organismo*

*Aspergillus nidulans* es un hongo filamentoso perteneciente al género *Aspergillus*. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se caracteriza por un rápido crecimiento (48-72 hs) en una extensa variedad de sustratos.

El genoma de *Aspergillus nidulans* se encuentra secuenciado y es relativamente pequeño en comparación con el de otros organismos eucariotas, lo que facilita su análisis (Galagan et al., 2005). Asimismo, su genoma es relativamente sencillo de manipular por diversas metodologías, lo que permite generar mutantes, estudiar vías metabólicas, producir proteínas recombinantes, etc. (Szewczyk, et al., 2006; Todd, Davis, & Hynes, 2007; Tilburn, et al., 1983). Asimismo, se cuenta con una diversidad de marcadores de selección auxotróficos, lo que facilita su modificación genética.

Por otra parte, *A. nidulans* comparte muchas similitudes con otros hongos y con eucariotas superiores, incluyendo la conservación de rutas metabólicas y vías de señalización celulares. Esto permite extrapolar los resultados obtenidos a otros sistemas biológicos.

Sus características genéticas, ciclo de vida, vías metabólicas y respuesta a diferentes estímulos lo convierten en un organismo de interés para estudios sobre regulación génica y postraducciona, vías de señalización celular, procesos de desarrollo y respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Además de su valor como organismo modelo, algunos miembros del género *Aspergillus*, incluyendo *A. nidulans*, pueden actuar como patógenos oportunistas y causar infecciones en humanos y animales, lo que

también ha despertado interés en su estudio desde el punto de vista médico. La combinación de su facilidad de cultivo y manipulación genética, ciclo de vida, estructura del genoma y similitud con otros eucariotas hacen que *Aspergillus nidulans* sea un modelo valioso para la investigación en biología celular, molecular, genética y biotecnología (Felenbok et al., 2001; Frandsen et al., 2018; Goldman & Kafer, 2004).

#### 2.5.1.i. Ciclo de vida de *A. nidulans*

*Aspergillus nidulans* presenta principalmente dos tipos de reproducción: reproducción asexual y reproducción sexual (Figura 7).

La reproducción asexual comienza con la formación de los conidióforos, estructuras especializadas que se diferencian a partir de una hifa (hifa conidiófora). Los conidióforos producen esporas asexuales externas, también conocidas como conidias, que son liberadas al ambiente para germinar en un conjunto de hifas que forman el micelio, dando lugar a una nueva colonia y cerrándose así el ciclo. Estos pasos se repiten logrando que el hongo pueda esparcirse colonizando grandes superficies. Es importante destacar que en este proceso las células son haploides en todo momento (Lee et al., 2010).

El ciclo asexual es el que permite la generación rápida y eficiente de grandes cantidades de material genéticamente idéntico, proporcionando una fuente abundante y uniforme de material biológico. Otro punto importante a destacar, es que en este ciclo se mantiene la estabilidad genética a lo largo de las generaciones.

La reproducción sexual en *Aspergillus nidulans* involucra la formación de estructuras reproductoras específicas llamadas cleistotecios y ascos, en las que ocurre la meiosis y la formación de esporas sexuales. El ciclo comienza cuando dos colonias entran en contacto y unen sus hifas en un proceso de fusión celular que se conoce como plasmogamia, conduciendo a la formación del cleistotecio. El cleistotecio es una estructura cerrada y esférica donde se formarán los ascos, que son sacos que van a contener las ascosporas (células sexuales). El proceso implica una etapa de fusión de núcleos conocida como cariogamia, que conduce a la generación de núcleos diploides

que posteriormente sufrirán meiosis y mitosis para dar 8 núcleos haploides. La maduración de estos núcleos haploides da como resultado la formación de ascosporas binucleadas. Estas son liberadas cuando el cleistotecio se rompe iniciándose un nuevo ciclo de crecimiento y reproducción. Este tipo de ciclo es utilizado en el laboratorio como una herramienta para obtener cepas con variedad en la combinación de marcadores de selección auxotrófico, realizar un mapeo genético, así como también “transferir” mutaciones entre cepas.

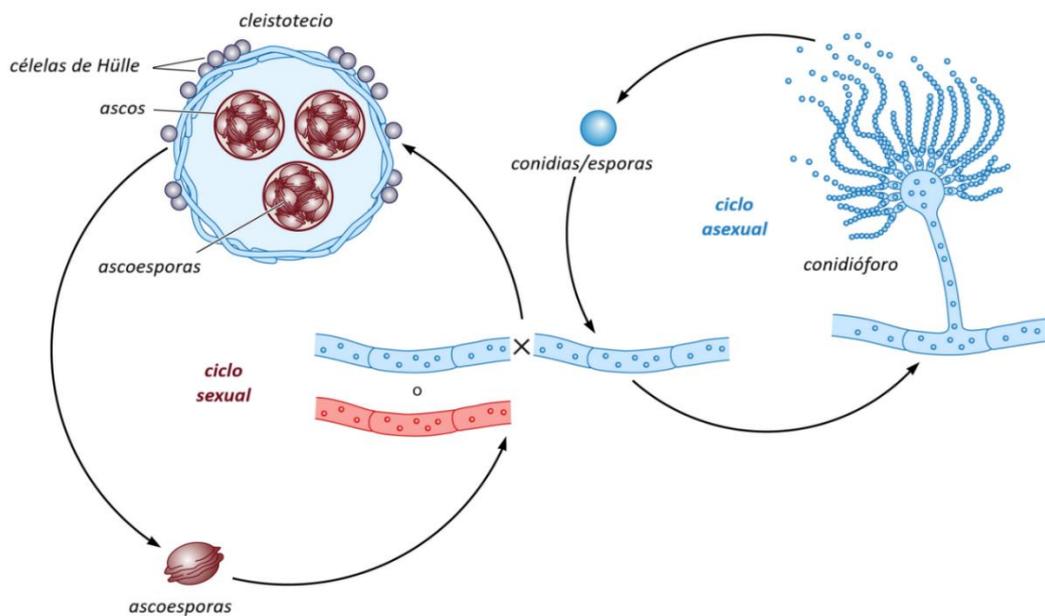


Figura 7. Ciclos de reproducción sexual y asexual de *A. nidulans*. Modificado de (Lee et al., 2010). El ciclo de reproducción sexual comienza con la fusión de hifas “parentales” permitiendo un intercambio de núcleos, que posteriormente se fusionaran para dar lugar a la formación de una estructura de reproducción sexual denominada cleistotecio. Dentro de los cleistotecios se encuentran los ascos, que contienen las ascosporas. Las ascosporas, que son producto del intercambio genético, darán lugar a una nueva colonia que no será genéticamente idéntica los “parentales”, sino que será una mezcla de ambos. La reproducción asexual comienza con la diferenciación estructural de una hifa en una estructura de reproducción asexual denominada conidióforo. En el conidióforo se producirán conidias/esporas, que darán lugar a colonias idénticas entre sí.

### 2.5.2. Estudio de transportadores en *A. nidulans*

En *A. nidulans* se han identificado y caracterizado diversos sistemas de transporte de solutos y iones. Este hongo filamentoso posee ejemplos de todas las categorías de proteínas de membrana (<http://membranetransport.org/www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>), con más de 700 genes involucrados en estos procesos, lo que representa aproximadamente un 7% de su genoma. Además, este organismo presenta una serie de ventajas experimentales que lo hacen un modelo propicio para el estudio de este tipo de proteínas:

#### *2.5.2.i. Análisis de crecimiento en placa*

Es posible emplear este tipo de análisis para evaluar el fenotipo de mutantes en genes de transportadores. Si un transportador es esencial para la captación de un metabolito necesario para el crecimiento, su ausencia se traduce en un fenotipo visible, pudiendo distinguir entre fenotipos de tipo crece/no crece y fenotipos de crecimiento intermedio. En algunos casos, se pueden utilizar análogos tóxicos que ingresan a la célula por el mismo transportador para inducir fenotipos de toxicidad detectables.

#### *2.5.2.ii. Ensayos de cinética de transporte*

Como los transportadores poseen un sitio de unión específico para su sustrato, su actividad puede describirse mediante la cinética de Michaelis-Menten. Se utilizan sustratos marcados radioactivamente para medir parámetros cinéticos como la afinidad ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_m$ ), lo que permite caracterizar su eficiencia y especificidad (Diallinas, 2013).

#### *2.5.2.iii. Marcado fluorescente de transportadores*

Mediante la fusión de transportadores con proteínas fluorescentes como GFP (Apostolaki et al., 2009; Pantazopoulou et al., 2007; Tavoularis et al., 2001; Valdez-Taubas et al., 2004; Vlanti & Diallinas, 2008), es posible realizar estudios de localización subcelular a través de microscopía de fluorescencia. Esta técnica permite evaluar, por ejemplo, si una mutación afecta el tráfico y localización del transportador en la célula. A su vez, la GFP puede utilizarse como etiqueta para detección en ensayo de WB que permiten evaluar la estabilidad de la fusión del transportador de interés a GFP.

#### 2.5.2.iv. Mutagénesis aleatoria y dirigida

Dado que los transportadores de membrana son difíciles de estudiar mediante biología estructural, se utilizan estrategias genéticas para analizar la relación estructura-función. La mutagénesis dirigida y mutagénesis aleatoria clásica, permiten obtener mutantes con alteraciones en la cinética, estabilidad o especificidad del transportador, siendo estos observables en primera instancia mediante un fenotipo de crecimiento o resistencia de determinados sustratos. Estos enfoques han permitido caracterizar en detalle transportadores clave en *A. nidulans*, como NrtA (transportador de nitrato) (Kinghorn et al., 2005), PrnB (transportador de prolina) (S. N. Tavoularis et al., 2003; Tazebay et al., 1994), UapA (transportador de ácido úrico/xantina) (Amillis et al., 2001; Diallynas & Scazzocchio, 1989; Koukaki et al., 2005; Meintanis et al., 2000) y UreA (transportador de urea) (Sanguinetti et al., 2014).

#### 2.5.3. UreA

UreA es el principal transportador de urea/H<sup>+</sup> en *Aspergillus nidulans* y juega un papel esencial en la captación de urea como fuente de nitrógeno. Se trata de un simportador de alta afinidad por la urea perteneciente a la familia de simportadores de soluto-sodio (SSS), aunque, a diferencia de otros miembros de esta familia, emplea protones en lugar de sodio para el cotransporte. Esta proteína cuenta con homólogos caracterizados tanto en plantas (AtDur3 y OsDur3), como en hongos (ScDur3, PiDur3 y CaDur3). Juntos, estos homólogos conforman una subfamilia dentro de la Superfamilia de Simportadores de Sodio, lo que sugiere una conservación estructural y funcional a lo largo de distintos grupos taxonómicos (Abreu et al., 2010; Liu et al., 2003).

UreA es una proteína de 693 aminoácidos organizada en 15 STM predichos, codificada por el gen *ureA* (Abreu et al., 2010). La regulación de *ureA* es compleja y ocurre tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Su expresión está sujeta a represión por amonio (fuente preferencial de nitrógeno) (Arst & Cove, 1973; Caddick, 1994). Como se mencionó anteriormente la urea puede ser utilizada por *A. nidulans* como fuente no preferencial de nitrógeno. Esta debe ser degradada a amonio para que

sea utilizable en la síntesis de compuestos nitrogenados, entre otros procesos. Sin embargo, en presencia de una fuente de nitrógeno más eficiente, como el amonio, se reprime la expresión de UreA. Además, UreA no es inducible por sus sustrato en particular (urea), sino que su expresión está regulada en respuesta a la disponibilidad de fuentes de nitrógeno (Pateman et al., 1982).

Mediante la generación de una fusión de UreA a la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP), la cual no afecta su funcionalidad, se pudo determinar que la presencia de amonio promueve su endocitosis, lo que sugiere un mecanismo de regulación postraduccional que responde a la disponibilidad de fuentes preferenciales de nitrógeno (ver antecedentes del trabajo de investigación).

Mediante un análisis de modelado, mutagénesis aleatoria clásica y dirigida, se ha logrado comprender el rol de ciertos aminoácidos conservados, que son clave en los procesos de transporte, biosíntesis y determinación de la estructura y localización subcelular (Sanguinetti et al., 2014). Incluso, mediante el modelado tridimensional de UreA, se ha logrado proponer un mecanismo de translocación del sustrato (Sanguinetti et al., 2022).

## **2.6. Antecedentes del trabajo de investigación**

Estudios previos del equipo de investigación lograron obtener resultados preliminares sobre la ubiquitinación de UreA en condiciones de internalización endocítica en respuesta a la adición de amonio al medio de cultivo (Figura 8). Mediante un análisis de mutagénesis dirigida de UreA-GFP, se identificó un motivo ácido DEESEE en el extremo C-terminal del transportador, así como también dos lisinas candidatas a ser ubiquitinadas (Lys 689 y Lys 693). Mediante microscopía de epifluorescencia se observó que los mutantes K689R (sustitución de la lisina 689 por arginina), K693R (sustitución de la lisina 693 por arginina), K689/K693R (ambas lisinas sustituidas por arginina) (Figura 9a y 9b) y DEESEE/A6 (sustitución del motivo DEESEE por alaninas) (Figura 9c) presentaban una disminución significativa en la internalización endocítica en respuesta a amonio (estímulo de internalización de UreA) respecto a la versión salvaje

de UreA-GFP, sugiriendo que dichos factores son esenciales en el proceso de internalización endocítica. En cuanto a los factores en *trans*, se observó que una cepa que porta la delección del gen *artA* ( $\Delta artA$ ), el cual codifica para la  $\alpha$ -arrestina ArtA, así como una cepa que porta la ubiquitín ligasa Hula de forma inactiva (*hula* $\Delta C2$ ) (Karachaliou et al., 2013), son incapaces de internalizar a UreA-GFP. Este comportamiento es similar al observado en los mutantes mencionados anteriormente en presencia de amonio y contrasta con la internalización que tiene lugar en las cepas UreA-GFP, *artA* y *hula* silvestres (ver Figura 10).

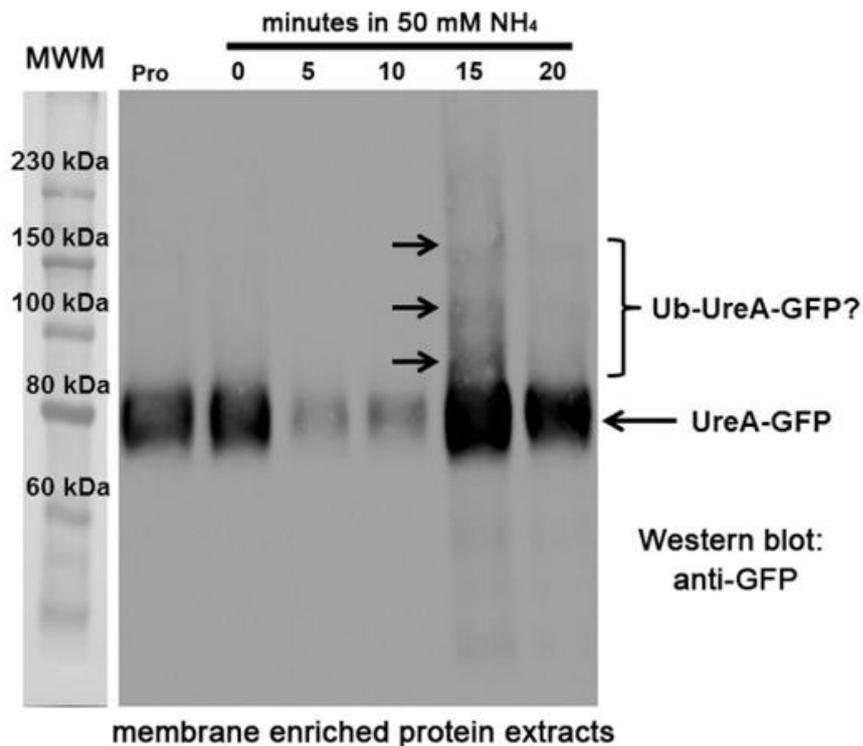


Figura 8. Resultados preliminares de la ubiquitinación de UreA. Western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP en extractos de proteínas enriquecidos en membrana, obtenidos a partir de un cultivo durante toda la noche de una cepa *ureA::gfp* en presencia de prolina (5 mM) como fuente de nitrógeno no represiva. Posteriormente, se añadió amonio ( $NH_4^+$ , 50 mM) durante los tiempos indicados. En presencia de amonio, dentro de los primeros 15 minutos, se observan agregados de mayor peso molecular, que podrían corresponder a versiones ubiquitinadas de UreA-GFP (Ub-UreA-GFP).

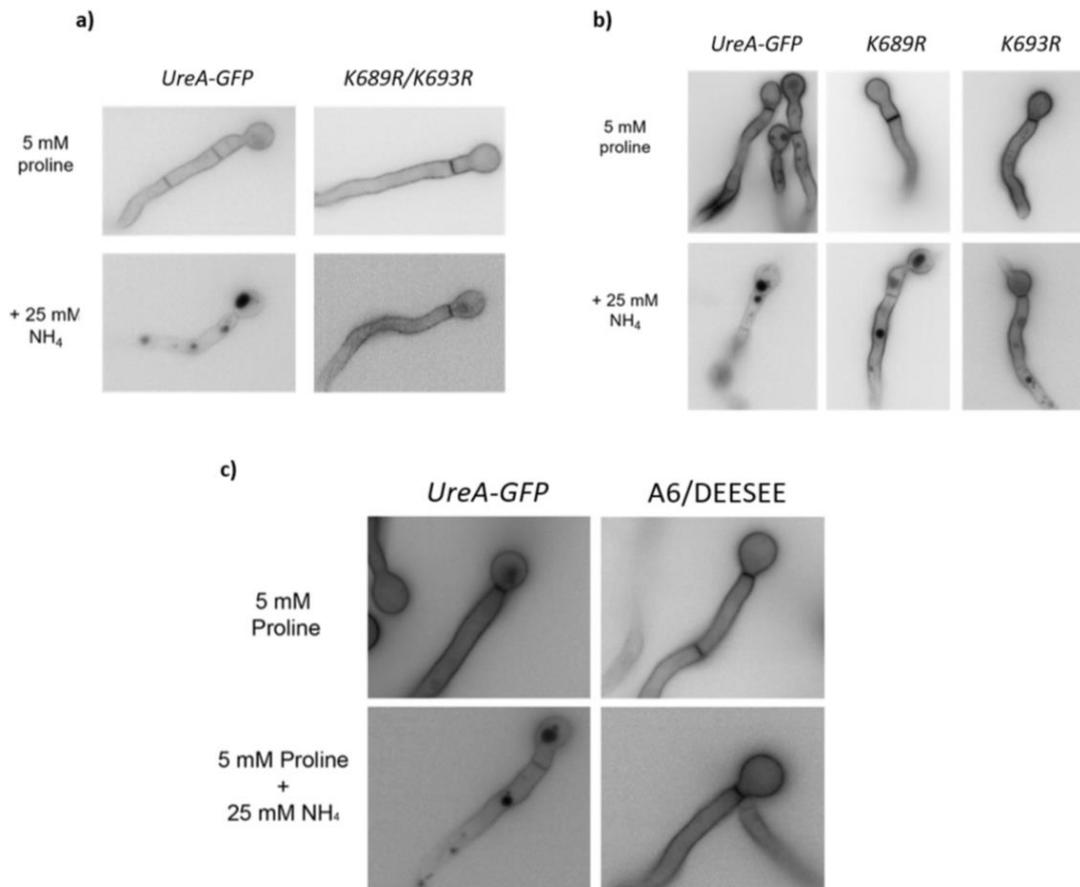


Figura 9. Seguimiento mediante microscopia de epifluorescencia de la localización subcelular de UreA-GFP, sus versiones mutantes (K689R, K693R, K689R/ K693R, DEESE/A6) y UreA-GFP en condiciones endocíticas ( $\text{NH}_4^+$ ) y no endocíticas (prolina).

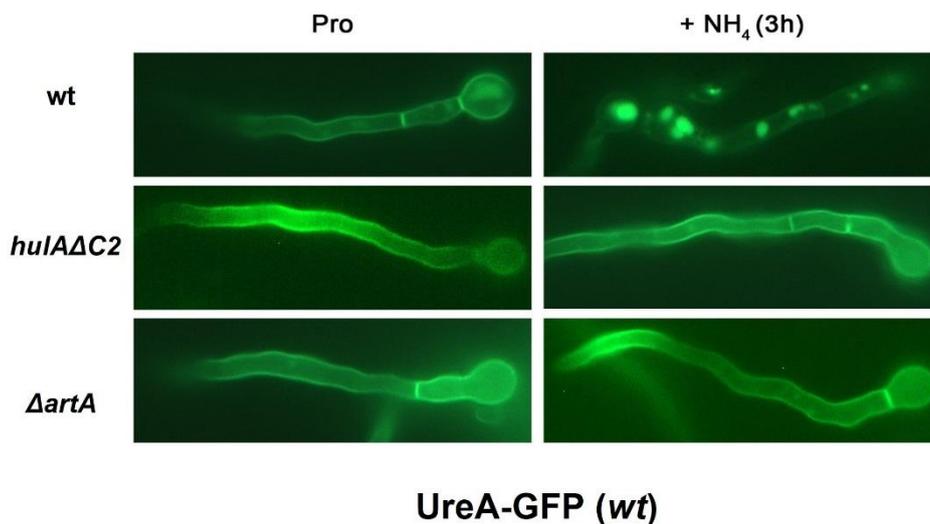


Figura 10. Seguimiento mediante microscopia de epifluorescencia en condiciones endocíticas ( $\text{NH}_4^+$ ) y no endocíticas (prolina) de la localización subcelular de UreA-GFP, en contexto de ( $\Delta\text{artA}$ ), delección del gen codificante para la  $\alpha$ -arrestina ArtA y ( $\text{hula}\Delta\text{C2}$ ) ubiquitin ligasa HULA inactiva.

Tras haber identificado los posibles factores en *cis* y en *trans* involucrados en la internalización endocítica y la posible ubiquitinación de UreA, se plantea la hipótesis de que la  $\alpha$ -arrestina ArtA, a través de sus motivos PPxY, sea capaz de reconocer y reclutar a la ubiquitín ligasa HulaA mediante interacción con los motivos WW presentes en esta última. De este modo, ArtA facilitaría el reclutamiento de HulaA hacia las proximidades de las lisinas localizadas en el extremo C-terminal de UreA, a través del reconocimiento del motivo DEESEE presente en dicha región, lo que desencadenaría la ubiquitinación del transportador y su posterior internalización endocítica. (Figura 11).

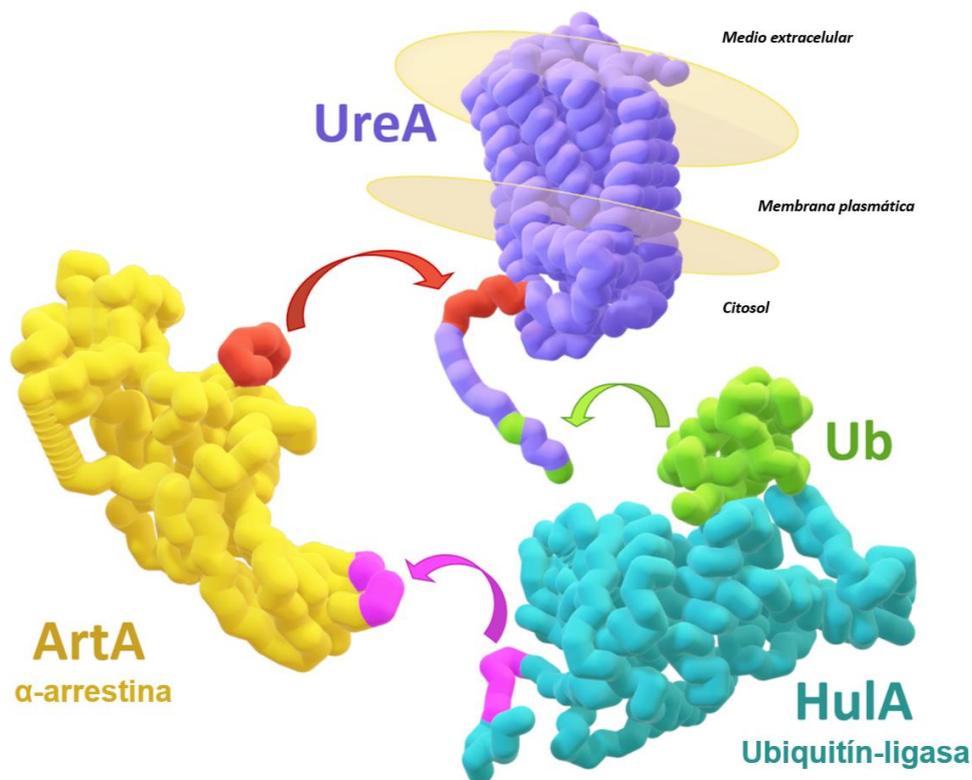


Figura 11. Representación esquemática del modelo de interacción propuesto utilizando como ejemplo el transportador UreA de *A. nidulans* interaccionando con el complejo HulaA–ArtA. En color rojo se encuentran representados el motivo ácido DEESEE del transportador UreA y el dominio arrestina del adaptador ArtA. En rosa se indica uno de los motivos PPxY de la  $\alpha$ -arrestina y el motivo WW de HulaA. Finalmente, en verde se encuentran marcados la ubiquitina cargada en HulaA y las lisinas candidatas a ser ubiquitinadas en el extremo C-terminal de UreA.

Si bien estos resultados resaltan la importancia del dominio C-terminal del UreA en el proceso de internalización endocítica y posterior reciclaje/degradación, se desconoce si los elementos en *cis* identificados en este dominio son suficientes para actuar como señal para la internalización del transportador. La presencia de otras regiones como los bucles citosólicos del transportador, en principio, también estarían accesibles a proteínas citosólicas como las ubiquitín ligasas y adaptadores, con lo cual, el motivo regulador podría estar conformado por la interacción simultánea de varias regiones del transportador, además del C-terminal.

Por ello, en este trabajo de investigación se propuso contribuir a dilucidar si el dominio C-terminal de UreA, por sí solo, es capaz de desencadenar la internalización endocítica. Para intentar responder esta pregunta, se decidió adaptar la estrategia planteada por (Karachaliou et al., 2013), la cual consiste en fusionar el dominio C-terminal de UreA (más el agregado de GFP) al transportador AzgA de *A. nidulans*. AzgA es un transportador de purinas especializado en el transporte de hipoxantina, adenina y guanina, así como del análogo tóxico de esta última, la 8-azaguanina. Este transportador pertenece a una subfamilia de proteínas de membrana que, aunque filogenéticamente relacionada con la familia de transportadores NAT (Nucleobase-Ascorbato Transporter), presenta características distintivas. AzgA es un simportador de protones, lo que significa que utiliza el gradiente de protones a través de la membrana celular para facilitar el transporte de sus sustratos (Cecchetto et al., 2004; Darlington & Scazzocchio, 1967).

Esta proteína es esencial para la utilización de purinas tanto en su función metabólica como fuentes de nitrógeno en la célula. La regulación de la expresión de AzgA es inducida en presencia de ácido úrico y reprimida por el amonio. Sin embargo, AzgA es sensible solo parcialmente a la internalización endocítica por estímulo con amonio (Cecchetto et al., 2004). Esta característica nos indujo a elegir a AzgA como herramienta para abordar la pregunta que da título a esta tesis: “¿Es capaz el dominio C-terminal de UreA de aumentar la endocitosis de AzgA?”

Así, decidimos evaluar si la adición del extremo C-terminal de UreA aumenta la sensibilidad de AzgA a la internalización inducida por amonio, analizando cepas que expresen las quimeras generadas, mediante ensayos de crecimiento en placa. Las fusiones, que incluirán además GFP, permitirán llevar a cabo microscopía de

epifluorescencia y ensayos de Western blot. Los resultados serán comparados con los de una cepa control, portadora de una fusión AzgA-GFP.

## **2.7. Objetivos**

### *2.7.1. General*

Se buscará determinar si el añadido del dominio C-terminal de UreA es capaz de aumentar la endocitosis de AzgA en presencia de amonio. Además, se pretende dilucidar si el motivo DEESEE presente en el C-terminal de UreA es importante en dicho proceso.

### *2.7.2. Específicos*

- Generar construcciones génicas que incluyan AzgA-Ct.UreA-GFP y AzgA-Ct.UreA(m)-GFP (m: motivo DEESEE sustituido por alaninas) y expresarlas en *A. nidulans* de manera estable.
- Determinar la localización subcelular de las quimeras en condiciones de internalización (en presencia de  $\text{NH}_4^+$ ) mediante microscopia de epifluorescencia.
- Evaluar la degradación de las quimeras en respuesta a la adición de amonio, mediante Western blot.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Obtención de los cassettes génicos para la generación de las quimeras AzgA-Ct.UreA-GFP y AzgA-Ct.UreA(m)-GFP

Los *cassettes* génicos SCA1 y SCA2m que permiten la expresión de las quimeras AzgA-Ct.UreA-GFP y AzgA-Ct.UreA(m)-GFP (“m” indica la mutación en el motivo DEESE presente en el C-terminal de UreA), respectivamente, contienen todos los elementos necesarios para que ocurra la integración dirigida al locus *azgA*, así como también un marcador de selección y otros elementos necesarios para la correcta expresión (Figura 12).

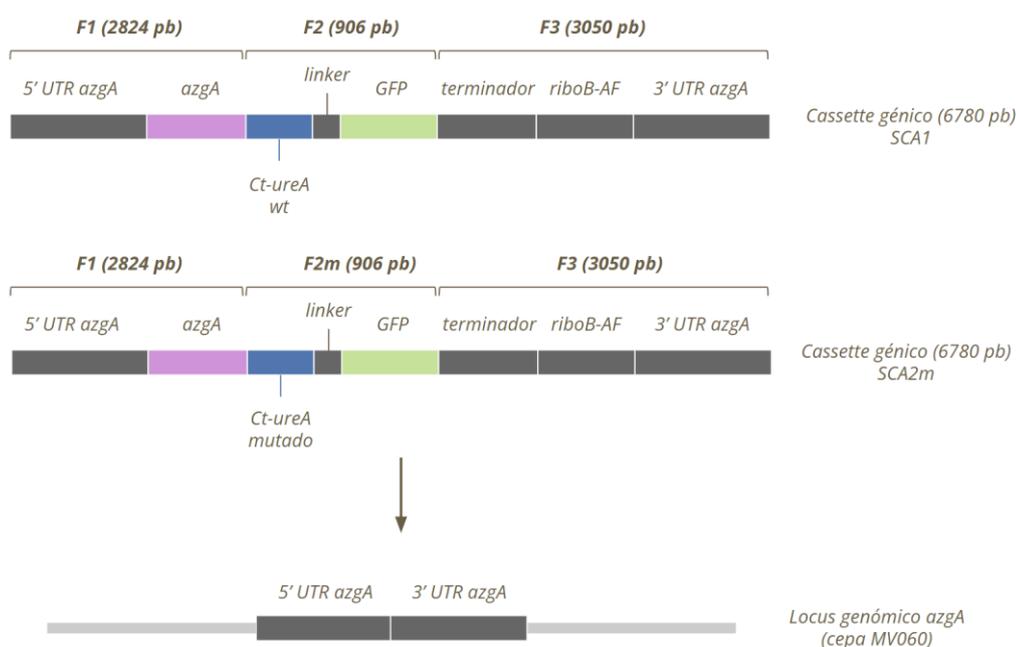
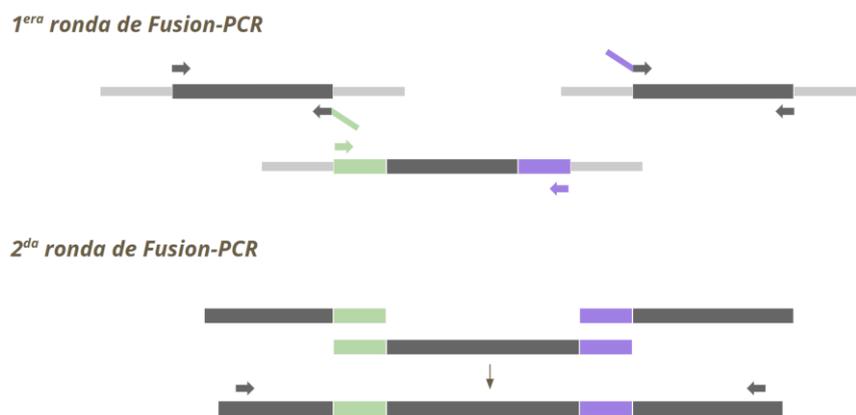


Figura 12. Cassettes génicos generados mediante Fusion-PCR. Cassette SCA1: F1: comprende la región 5'UTR del locus *azgA* y la secuencia que codifica para el transportador AzgA; F2: comprende la secuencia que codifica para el dominio C-terminal de UreA, un linker de 5 repetidos de GlyAla y la GFP, F3: comprende un terminador transcripcional, la secuencia que codifica para el marcador de selección *riboB* de *Aspergillus fumigatus* (*riboB-AF*) y la región 3'UTR del locus *azgA*; Cassette SCA2m: Los fragmentos F1 y F3 son los mismos que los utilizados para SCA1, F2m: comprende una porción de C-terminal de UreA conteniendo la mutación en el motivo DEESE, un linker de 5 repetidos de GlyAla, la GFP. En la región inferior se visualiza el locus donde se integrará la construcción por recombinación homologa en la cepa receptora (MV 060, ver Materiales y métodos).

Los *cassettes* génicos SCA1 y SCA2m fueron generados mediante el uso de la técnica Fusion-PCR (Oakley et al., 2006) (Figura 13). La Fusion-PCR es una técnica que permite la construcción de un *cassette* génico de manera sencilla y rápida. En una primera instancia (1<sup>era</sup> ronda de la Fusion-PCR) se amplifican los fragmentos a fusionar mediante PCR convencional, con la variante del uso de *primers* híbridos. Los *primers* híbridos son más extensos de lo normal (~40 nucleótidos), podría decirse que son dos *primers* unidos. Esto es importante, dado que contienen una región que hibridará en el gen que se quiere amplificar en la primera ronda y una región que solapará con el fragmento contiguo en una segunda ronda de PCR (Figura 13). En esta última ocurrirá la fusión de los fragmentos que compondrán el *cassette* génico y la amplificación del mismo a través del uso de *primers* anidados (*primers* “internos” a los extremos de los fragmentos que flanquean el *cassette* génico; esto permite una mejor eficiencia de amplificación).

#### **Fusion-PCR**



*Figura 13. Fusion-PCR. En la parte superior se indica la primera ronda de PCR en donde se amplifican los distintos fragmentos a partir de ADN genómico. Los primers se encuentran representados como flechas y su color indica la complementariedad respecto al molde. Los primers “híbridos” se muestran como una flecha con una extensión en diagonal representando el fragmento que solapa con el fragmento contiguo. En la región inferior de la figura se encuentra representada la segunda ronda de la PCR, en color verde y azul las regiones solapantes complementarias de cada fragmento y los primers anidados utilizados para la amplificación del *cassette* génico.*

Fue necesario una puesta a punto para la correcta amplificación de cada fragmento de manera de obtenerlos en una buena cantidad y con la menor amplificación inespecífica posible. Para ello, se variaron factores tales como la temperatura de hibridación de los *primers* (teniendo en cuenta la  $T_m$  de los mismos), la concentración del molde genómico utilizado e incluso el eventual agregado de Dimetilsulfóxido (DMSO) para amplificaciones de regiones difíciles, como fue el caso del extremo 5'UTR del gen *azgA* (Dra. Mariana Barraco, comunicación personal). En la Figura 14 se muestra un gradiente de temperaturas de hibridación empleado para amplificar el fragmento F1 (componente de SCA1). Se observa que, según lo esperado, la especificidad de la reacción aumenta con el aumento la temperatura. Este fragmento en particular, el cual contiene la región 5'UTR del gen *azgA*, así como la secuencia codificante del transportador de purinas AzgA, generó mayores complicaciones que el resto de los fragmentos, debiendo adicionar 10% DMSO al mix de amplificación para lograr su amplificación. Este resultado proporcionó un primer indicio sobre las dificultades del locus del gen *azgA*. Los restantes fragmentos (F2 y F3) que componen SCA1 no generaron mayores complicaciones en su amplificación. Asimismo, la amplificación del fragmento F2m, componente de SCA2m, se comportó de manera similar al fragmento F2 (figura 14).

Es importante destacar que la amplificación de cada fragmento se realizó utilizando una baja cantidad de ciclos (25 ciclos) y una polimerasa de alta fidelidad de manera de disminuir la posibilidad de introducir mutaciones en los *cassettes* génicos.

Los fragmentos obtenidos por PCR convencional fueron purificados utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos) de manera de eliminar cualquier producto inespecífico minoritario, así como los *primers* utilizados en las reacciones, que pueden. Fue necesario purificar 2 o 3 reacciones de PCR por cada fragmento para obtener una adecuada concentración tras el proceso de purificación (en la tabla 1 se detallan las concentraciones obtenidas).

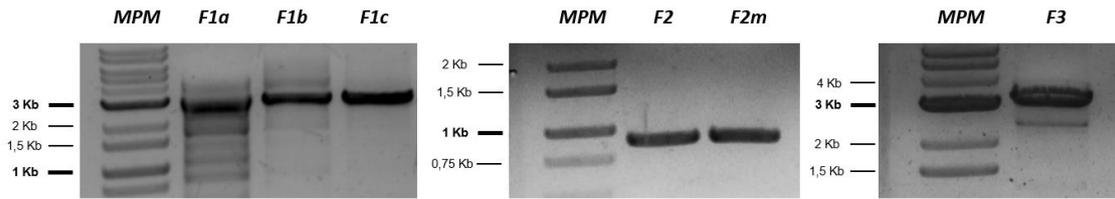


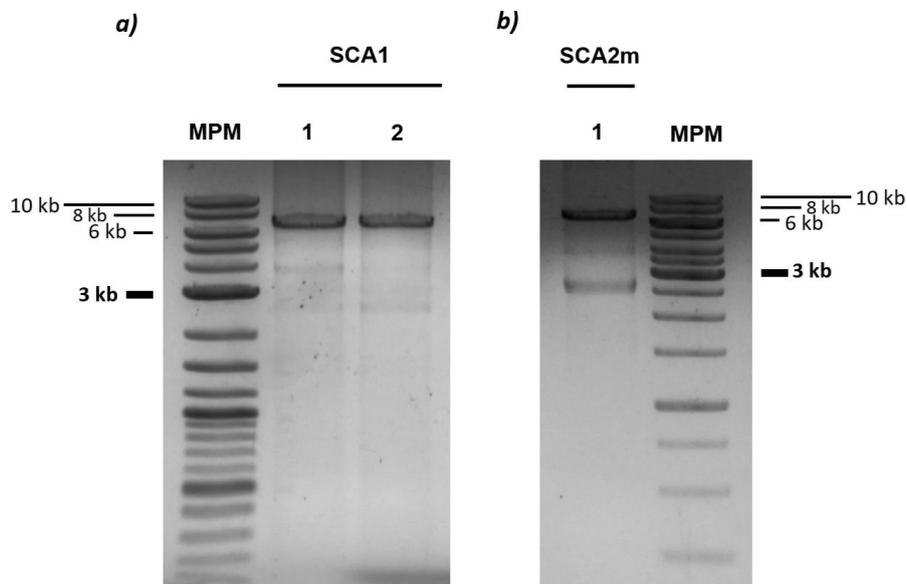
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la amplificación de los fragmentos F1, F2, F2m y F3 correspondientes a los cassette SCA1 y SCA2m. Se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) 1Kb plus DNA Ladder RTU (Bio-Helix) para todos los geles. F1a, F1b y F1c se corresponden al fragmento F1 amplificado variando la temperatura de hibridación en 52, 55 y 58 °C respectivamente.

Tomando en cuenta la concentración de los fragmentos purificados se planificó la segunda ronda de PCR (la cual permite la fusión de estos fragmentos), calculando los volúmenes necesarios para generar dos *mix* de fusión: uno con 25 ng de cada fragmento y otro con una relación equimolar de los mismos. Esto se realizó con la finalidad de abarcar posibles variantes que alteren el rendimiento de la fusión. Sin embargo, como se visualiza en la Figura 15 no se observaron diferencias significativas entre uno u otro *mix* de fusión utilizado.

Para cada una de las fusiones, la banda de tamaño esperado fue purificada con un kit comercial eliminándose fusiones parciales y *primers*. Al igual que en con los fragmentos, fue necesario juntar varias reacciones de PCR independientes para obtener una concentración adecuada de cada *cassette* (concentraciones detalladas en tabla 1), acorde al protocolo de transformación utilizado (ver Materiales y Métodos). Es importante destacar que las purificaciones se realizaron migrando los productos de PCR en geles de agarosa al 0,8 %. Esta concentración de agarosa es adecuada para obtener una buena concentración de la fusión luego de eluir. La utilización de altas concentraciones de agarosa puede dificultar la disolución de las bandas cortadas del gel y obstruir las columnas de purificación.

Con respecto a *cassette* SCA1, no se tuvieron mayores complicaciones a la hora de fusionar los fragmentos, resultando en una correcta fusión, que además se obtuvo en una alta concentración de manera posterior al purificado. Por otro lado, SCA2m resulto en un rendimiento menor (ver tabla 1), obteniéndose una cantidad final un poco por

debajo lo recomendado para transformar según el protocolo utilizado (ver materiales y métodos). Aun así, se procedió a transformar la cepa MV 060 con ambas construcciones.



*Figura 15f. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la correcta fusión de los fragmentos en la generación de los cassette SCA1 y SCA2m, MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). a) Fusión SCA1, con un tamaño esperado de 6895 pb. 1: fusión utilizando 25 ng de cada fragmento, 2: fusión utilizando igual número de copias por fragmento. b) Fusión SCA2m, con un tamaño esperado de 6895 pb utilizando 25 ng de cada fragmento.*

Tabla 1. Concentraciones de los fragmentos y *cassettes* purificados.

	Concentración ng/ $\mu$ L
F1	52,1
F2	40,1
F3	63,0
F2m	59,7
SCA1	62,6
SCA2m	30,8
F1m (mutagénesis) <sup>1</sup>	39,3
F2m (mutagénesis) <sup>1</sup>	31,6
SCA2m (mutagénesis) <sup>1</sup>	50,9

<sup>1</sup>. Segunda estrategia utilizada para generar el cassette SCA2m (ver más adelante)

### 3.2. Transformación de la cepa MV060.

Una vez obtenidas las construcciones deseadas, se procedió a transformar la cepa MV060 de *A. nidulans*. Esta cepa presenta una mutación con pérdida de funcionalidad en el gen *riboB* (mutación *riboB2*). Este gen codifica una enzima necesaria para la síntesis de riboflavina (o vitamina B2, esencial para el crecimiento del hongo), por lo que MV060 es incapaz de crecer en un medio que no esté suplementado con dicho nutriente. Además, también presenta deleciones del gen *azgA* (transportador que forma parte de la quimera a expresar), pero también de los genes *uapA* y *uapC*, codificantes para transportadores de purinas, que podrían generar un ruido de fondo, imposibilitando analizar la funcionalidad de las quimeras mediante ensayos de crecimiento en placa. Estos ensayos se realizan utilizando hipoxantina, una purina sustrato de AzgA, como única fuente de nitrógeno, evaluándose el fenotipo de crecimiento y relacionarlo con el transporte de hipoxantina. Finalmente, se debe destacar la deleción del gen *nkuA* que porta la cepa MV060. Este gen participa de la reparación del ADN a través de la recombinación no homologa, con lo cual, esta deleción favorece la integración de los *cassettes* en el locus deseado (a través de la recombinación homologa) y no en otras partes del genoma.

En base a lo anteriormente mencionado, los constructos génicos para expresar las quimeras AzgA-Ct.UreA-GFP y AzgA-Ct.UreA(m)-GFP fueron generados conteniendo como marcador de selección auxotrófico el gen *riboB-AF* (gen *riboB* de *Aspergillus fumigatus*). Es por esto que los medios selectivos utilizados para la selección de transformantes carecen de riboflavina, permitiendo únicamente el crecimiento de protoplastos transformados. De haberse utilizado el gen *riboB* de *A. nidulans* en vez del gen heterólogo de *A. fumigatus* podría darse la integración exclusiva del marcador (y por tanto la selección de transformantes protótrofos para la riboflavina) sin integración de los cassettes de interés al locus *azgA*. Además de una placa de transformación también se crecieron controles negativos (plaqueo de protoplastos sin la adición de los *cassettes* SCA1/SCA2m) y controles de viabilidad de los protoplastos (plaqueo de protoplastos sobre medio suplementado con riboflavina; no selectivo).

Como resultado de la transformación se obtuvieron varios transformantes candidatos a contener SCA1/SCA2m en su genoma. Además, no se visualizó crecimiento en el control negativo, validando el ensayo.

Un problema que puede surgir a la hora de transformar este tipo de organismo es la ocurrencia de fusión de protoplastos. La fusión de protoplastos ocurre cuando dos protoplastos se encuentran lo suficientemente cerca para fusionar sus membranas, esto conduce a la producción de una cepa que contiene núcleos provenientes de distintas células. Si la fusión ocurre entre un protoplasto transformado y uno salvaje, como resultado se obtiene una cepa heterocarionte capaz de producir esporas (las esporas son uninucleadas) a partir de un núcleo u otro, generando esporas salvajes y esporas transformantes que darán lugar a una progenie salvaje o transformante respectivamente. Para eliminar este problema se preparan suspensiones de esporas a partir de los transformantes primarios y se plaquean en medios selectivos, permitiendo el crecimiento únicamente de aquellas esporas que provengan de un núcleo transformado. Este proceso se denomina purificación de transformantes.

### 3.2.1. Ensayos de crecimiento en placa.

Los transformantes purificados se organizaron en una “placa madre” de medio completo suplementada con riboflavina, junto con la cepa receptora (MV060), la cepa ANAZ 121 (cepa control experimental, portadora de la fusión AzgA-GFP) y cepas de control de las auxotrofías (P003 y MVD 001) (ver Materiales y Métodos). A partir de la placa madre es posible generar réplicas sobre medio mínimo conteniendo diferentes suplementos de manera sencilla, sin tener que picar cepa por cepa en los distintos medios selectivos. De este modo, se pueden analizar y verificar las auxotrofías y la funcionalidad de las quimeras.

Todas las cepas transformantes analizadas fueron capaces de crecer en ausencia de riboflavina, sugiriendo la integración de los *cassettes* de transformación en el genoma de la cepa receptora. No obstante, cuando las cepas se crecieron en un medio con hipoxantina como única fuente de nitrógeno, solo algunas de las cepas transformantes presentaron el fenotipo característico de las cepas *azgA* silvestres (visualizado en cepa ANAZ 121; control experimental), resultando las restantes con un fenotipo similar al mostrado por la cepa receptora MV 060,  $\Delta azgA$  (Figura 16).

Esta diferencia de crecimiento entre las cepas transformantes puede deberse a diferentes eventos de integración de los *cassettes*. Por un lado, puede que en aquellos que muestran fenotipo  $\Delta azgA$  los *cassettes* se hayan integrado parcialmente, incorporándose únicamente el marcador de selección. Sin embargo, llama la atención la alta proporción de transformantes con fenotipo  $\Delta azgA$  obtenida. En este sentido, se podría pensar que la integración de los *cassettes* al locus da como resultado una proteína quimera que es menos estable o menos funcional. Otra posibilidad sería que la integración del *cassette* al locus *azgA* se vea dificultado por características estructurales de la cromatina del locus. Los transformantes con fenotipo *azgA* silvestre podrían entonces resultar de una o múltiples integraciones en otras regiones del genoma, lo que podría verificarse a futuro mediante Southern blot. Sin embargo, dado que la cepa receptora es  $\Delta nku$ , las integraciones ilegítimas deberían estar desfavorecidas. El fenotipo de crecimiento disminuido para los transformantes también puede estar asociado a mutaciones con pérdida de funcionalidad en el gen *azgA* presente en el

*cassette*, pero la utilización de una enzima de alta fidelidad para realizar las PCRs hace esta explicación poco probable.

Particularmente para los transformantes con SCA2m no se logró obtener un fenotipo AzgA silvestre en ninguno de los transformantes, repitiéndose este fenotipo en todas las transformaciones realizadas. Este resultado induce a pensar sobre cómo puede estar afectando la mutación en el motivo DEESE (sustitución por un repetido de alaninas) del C-terminal de UreA presente en la quimera. Una hipótesis planteada fue que la mutación, en el contexto de la quimera, puede estar afectando el plegamiento tridimensional del C-terminal de UreA, afectando el plegamiento del resto de la quimera.

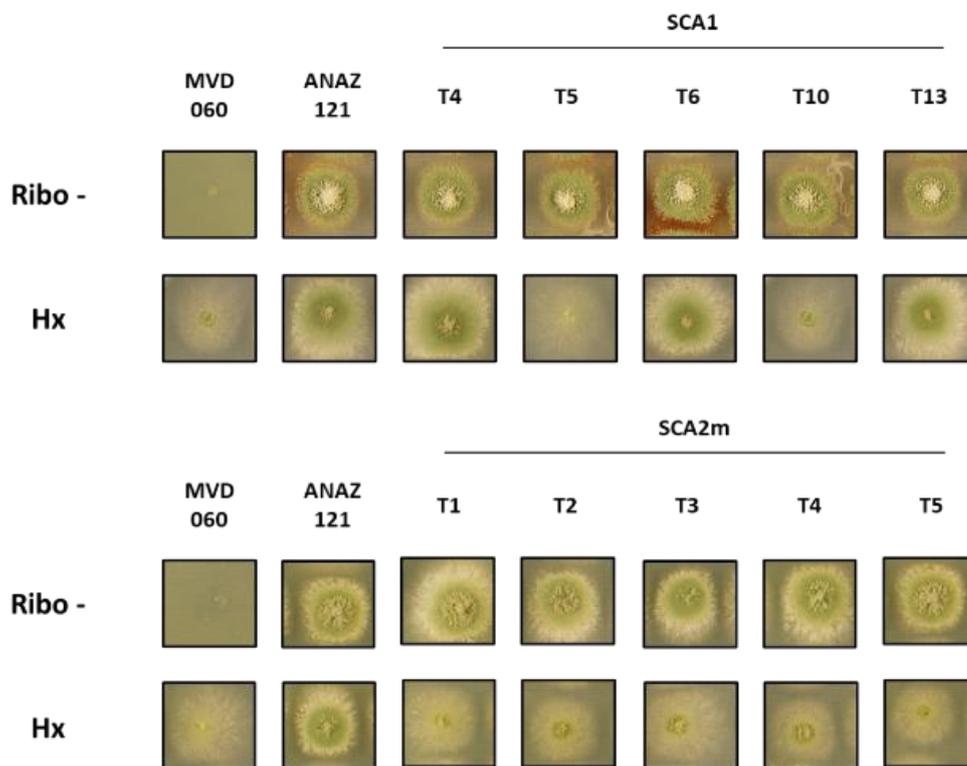


Figura 16. Ensayos de crecimiento en placa de los transformantes obtenidos a 37°C por 48 hs. Ribo -: medio sin riboflavina), Hx: crecimiento en hipoxantina como única fuente de nitrógeno. Se analizaron los transformantes purificados para ambos cassettes (SCA1 y SCA2m), junto con la cepa receptora MV 060 y la cepa control experimental (ANAZ 121, portadora de AzgA-GFP silvestre). T: transformante.

### 3.3. Verificación de integración del cassette génico en el locus *azgA*

Como se mencionó anteriormente se obtuvieron dos fenotipos de transformantes, *azgA* silvestre (únicamente para las transformaciones realizadas con el *cassette SCA1*) y  $\Delta azgA$  (obtenidos en ambas transformaciones SCA1/SCA2m). Para poder responder a qué se debe esta diferencia fenotípica, se procedió a la extracción de ADN genómico de ambos tipos de transformantes. Como transformante con fenotipo *azgA* silvestre se seleccionó T4, generado a partir de SCA1, y por otro lado, se utilizaron T5 SCA1, T1 SCA2m y T2 SCA2m como transformantes con fenotipo  $\Delta azgA$  (Figura 16). A partir sus ADNs genómicos se planificaron PCRs para determinar la presencia/ausencia de los *cassettes* en el locus *azgA* de las cepas transformantes.

La estrategia utilizada consiste en utilizar un *primer* interno que hibrida en el comienzo de la región codificante para el transportador AzgA y uno *externo* a la construcción génica de interés que es complementario a la región 3'UTR del locus *azgA* (Figura 17). De esta manera si se obtiene un amplicón se estaría confirmando la presencia de la construcción génica en el *locus* deseado. Como control positivo del ensayo se utilizó la cepa ANAZ 121, que contiene AzgA-GFP en el locus *azgA*.

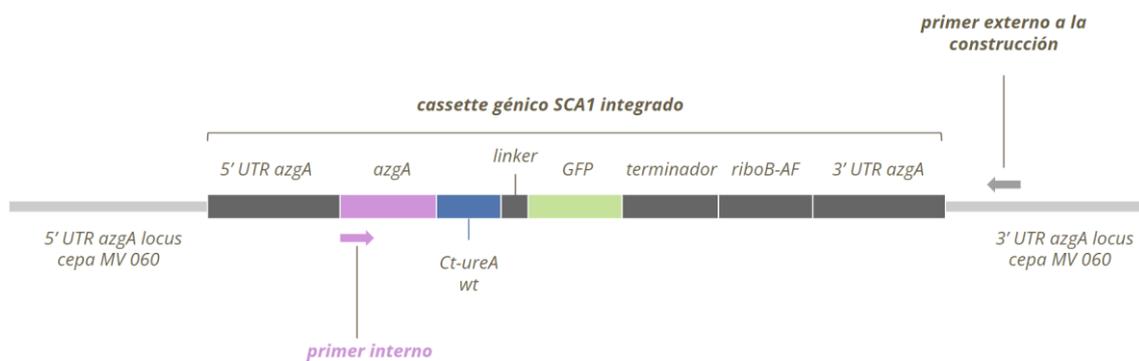


Figura 17. Representación esquemática del locus *azgA* de una cepa transformante. Las flechas indican la ubicación de los primers y su color la complementariedad con la secuencia genómica. En gris claro y línea más fina se muestran las regiones del locus *azgA* que quedan por fuera del cassette integrado.

Los productos de PCRs fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, logrando verificar que el transformante T4 presenta SCA1 en el locus *azgA*,

mientras que para el resto de los transformantes analizados (fenotipo  $\Delta azgA$ ) no se visualizó amplificación (Figura 18), lo cual estaría indicando que la construcción no se integró correctamente o se integró de manera parcial.

Una vez verificada la integración del *cassette* génico en el locus *azgA* en el transformante T4, se procedió a amplificar toda la secuencia codificante de la quimera (AzgA-Ct.UreA-GFP) y se envió a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) por el método de Sanger, para determinar posibles mutaciones que si bien, no estarían perjudicando el transporte de hipoxantina (verificada su funcionalidad por crecimiento en placa), podrían estar afectando el diseño experimental y por consiguiente los resultados esperados en los análisis posteriores. La secuencia codificante de AzgA-Ct.UreA-GFP no presentó, por lo que la cepa fue confirmada e indexada al cepario del laboratorio como MVD 2323 (llamaremos de esta manera al mutante generado de ahora en adelante).

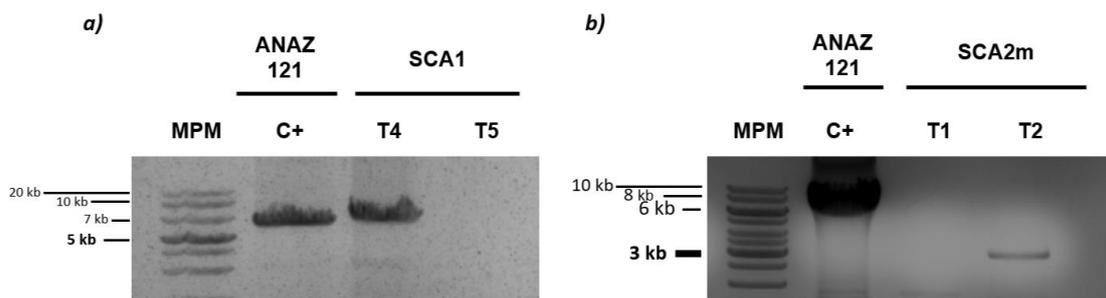


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la integración de los cassettes en el locus *azgA*. Como estrategia se utilizó un primer interno al *cassette* (región codificante del transportador *azgA*) y un primer externo (región 3'UTR de locus *azgA*) (ver figura 17). El tamaño esperado es de ~7 kb.

Como control se utilizó la cepa ANAZ 121, portador de AzgA-GFP. a) PCRs realizadas sobre los ADN genómicos de los transformantes T4 (fenotipo *azgA* salvaje) y T5 (fenotipo  $\Delta azgA$ ) transformados con el *cassette* SCA1. b) PCRs realizadas sobre los ADN genómicos de los transformantes T1 y T2 (ambos fenotipo  $\Delta azgA$ ) transformados con el *cassette* SCA2m.

### **3.4. Seguimiento subcelular de AzgA-Ct.UreA-GFP a través de microscopía de epifluorescencia.**

Para determinar si el añadido del dominio C-terminal de UreA es capaz de aumentar la sensibilidad a la internalización de AzgA en respuesta a la adición de amonio, se crecieron las cepas MVD 2323 (AzgA-Ct.UreA-GFP) y ANAZ 121 (AzgA-GFP, cepa control experimental) en condiciones de ausencia y presencia del estímulo de internalización (nitrato y amonio, respectivamente, ver materiales y métodos) y se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 19).

Ambas cepas muestran una distribución subcelular de las proteínas fusionadas a GFP en la membrana plasmática de las hifas cuando son cultivadas en un medio con nitrato como fuente de nitrógeno (fuente secundaria de nitrógeno). En base a estos resultados se puede deducir que el añadido de Ct.UreA no interrumpe, al menos de manera sustancial, la llegada de los transportadores a la membrana plasmática (lo que concuerda con los ensayos de crecimiento en placa, Figura 16). Sin embargo, puede observarse una pequeña disminución en la intensidad de fluorescencia para AzgA-Ct.UreA-GFP respecto a AzgA-GFP a nivel de membrana. No obstante, si bien existe una pequeña disminución en la fluorescencia a nivel de membrana para AzgA-Ct.UreA-GFP que podría asociarse a una disminución en la expresión, también existe un aumento en la fluorescencia de gránulos citoplasmáticos, que se pueden corresponder a un aumento en el recambio proteico (producto del añadido del dominio C-terminal de UreA), respecto de AzgA-GFP.

Por otro lado, el análisis de la señal de GFP en la cepa ANAZ 121 crecidas en un medio con amonio, no mostró diferencias en comparación con la condición sin el estímulo de internalización. En contraste, la cepa MVD 2323 presentó un cambio en la localización subcelular de la quimera AzgA-Ct.UreA-GFP, evidenciado por la ausencia de señal en la membrana plasmática y la concentración de fluorescencia en estructuras que son compatibles con las vacuolas celulares presentes en *A. nidulans*. Estos resultados destacan el papel del extremo C-terminal de UreA en la quimera, evidenciando un claro proceso de internalización y un probable direccionamiento hacia las vacuolas en respuesta a la presencia de amonio en el medio.

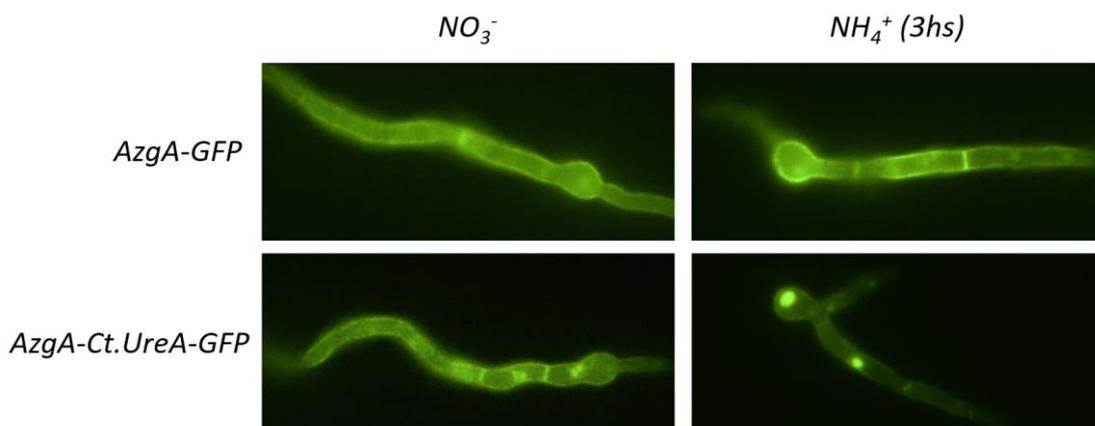


Figura 19. Seguimiento subcelular mediante microscopía de epifluorescencia, de *AzgA-GFP* y la quimera *AzgA-Ct.UreA-GFP* en condiciones no endocíticas ( $NO_3^-$ ) o endocíticas ( $NH_4^+$ ).

### 3.5. **Determinación de la degradación de *AzgA-Ct.UreA-GFP* mediante Western blot.**

Algo interesante sobre las quimeras, es que la GFP presente en las mismas exhibe una menor sensibilidad a la degradación vacuolar. Esto se debe a que su estructura en forma de barril formado por hojas  $\beta$  es altamente estable, por lo que la detección de GFP libre puede ser una medida indirecta estándar de la degradación vacuolar de proteínas de membrana fusionadas a GFP (Pinar et al., 2013; Shintani & Klionsky, 2004). Por lo tanto, una mayor presencia de GFP libre en el extracto proteico indicaría una mayor degradación de *AzgA-GFP/AzgA-Ct.UreA-GFP* y viceversa.

En base a esto, se procedió con la extracción total de proteínas de las cepas MVD 2323 (*AzgA-Ct.UreA-GFP*) y ANAZ 121 (*AzgA-GFP*), para luego analizar dichos extractos mediante Western blot (WB). El revelado del WB se realizó mediante el reconocimiento específico de GFP (mediante el uso del anticuerpo primario  $\alpha$ -GFP). De esta manera se puede determinar la presencia de la quimera, así como también su degradación mediante la presencia de GFP libre.

En el WB (Figura 20) pueden observarse distintas bandas que corresponderían a los distintos estados de agregación y degradación de la quimera. La diferencia de

migración visualizada para los extractos de MVD 2323 y ANAZ 121 se debe a la presencia del dominio C-terminal de UreA. La banda de mayor migración y que por tanto presenta un peso molecular menor se corresponde a GFP libre. Los extractos provenientes de las cepas crecidas sin el estímulo de  $\text{NH}_4^+$  lucen similares. No obstante, puede observarse un aumento en la banda correspondiente a GFP libre para AzgA-Ct.UreA-GFP. Esto podría estar indicando un aumento en la degradación basal, propio del recambio proteico, resultado que se puede extrapolar a la disminución en la intensidad de fluorescencia observada en la membrana, por microscopía de epifluorescencia. La hipótesis que se plantea es que los mecanismos que actúan en el recambio proteico basal no solo están actuando sobre la propia estructura de AzgA, sino que también sobre el C-terminal de UreA. Como la quimera presenta ambos dominios puede que el reconocimiento basal se vea aumentado generando una mayor degradación basal.

Por otro parte, en presencia del estímulo endocítico, las bandas que se corresponden a las fusiones proteicas (tanto AzgA-Ct.UreA-GFP como AzgA-GFP), se ven disminuidas en intensidad, indicando una degradación inducida por amonio. No obstante, la degradación fue mucho más pronunciada en AzgA-Ct.UreA-GFP indicando una mayor sensibilidad a este estímulo.

El análisis mediante WB permite concluir que la adición del extremo C-terminal de UreA incrementa la sensibilidad de AzgA a la degradación inducida por amonio, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de microscopía de EPI-fluorescencia.

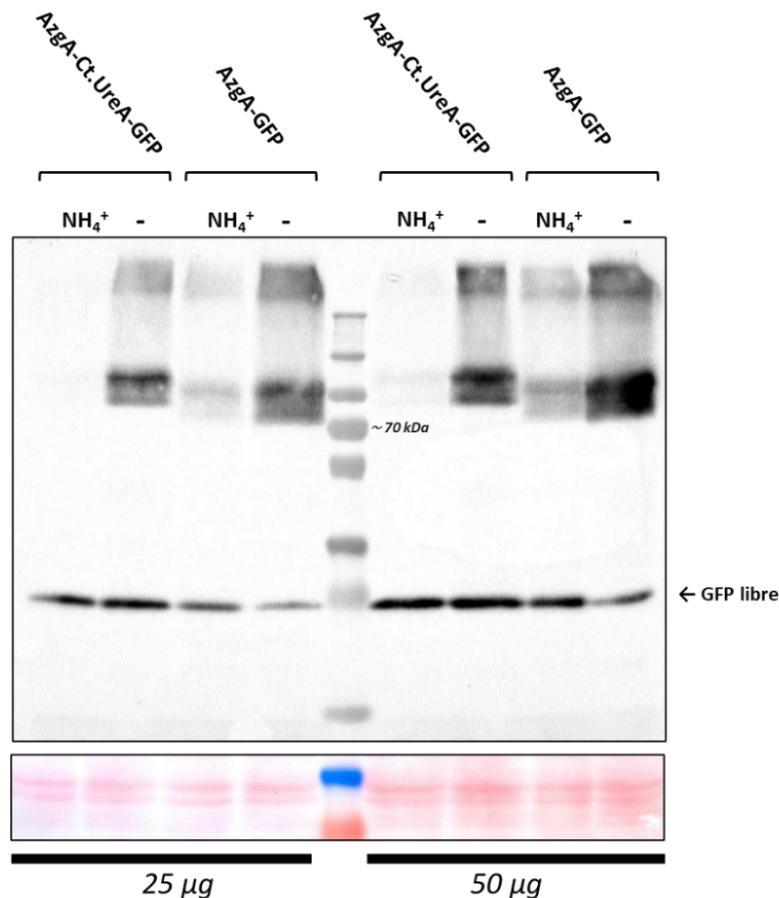


Figura 20. Western blot para extractos proteicos totales de las cepas ANAZ 121 (AzgA-GFP) y MVD 2323 (AzgA-Ct.UreA-GFP). Los extractos se obtuvieron a partir de cultivos con (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y sin (-) el estímulo de internalización. Se sembraron 25 y 50 µg de cada extracto (izquierda y derecha respectivamente). En la región inferior de la figura se muestra la tinción Ponceau como control de carga.

### 3.6. Nueva estrategia para generar el cassette SCA2m: Mutagénesis dirigida

Como se indicó previamente, no se logró obtener un transformante que tuviese integrado el *cassette* SCA2m. Una posible causa que pudo haber afectado la eficiencia en la obtención del transformante es la cantidad de *cassette* empleada durante el proceso de transformación. Por lo tanto, se propuso una nueva estrategia orientada a obtener el *cassette* en mayor cantidad.

Valiéndonos de la cepa ya generada, MVD 2323, la cual contiene integrado de manera estable el *cassette* SCA1, se procedió a realizar una mutagénesis dirigida sobre motivo DEESEE presente en el C-terminal de UreA de la quimera.

La mutagénesis tiene como particularidad el uso de *primers* híbridos internos, que no solo son complementarios al genoma utilizado para amplificar los fragmentos (genoma de la cepa MVD 2323), sino que también son complementarios entre sí. Esto permite que ambos fragmentos contengan una región solapante, que además contendrá la mutación deseada (DEESEE/A6) (figura 21).

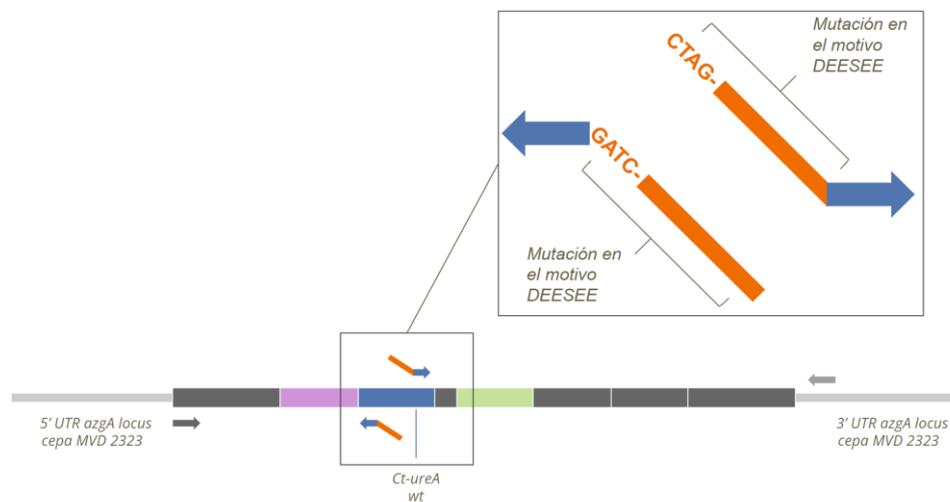


Figura 21. Esquema de mutagénesis utilizada para la generación del *cassette* SCA2m. En naranja se visualizan las regiones complementarias entre ambos primers híbridos, que a su vez codifican para un repetido de alaninas en sustitución del motivo DEESEE presente en C-terminal de UreA. Los primers externos utilizados, para realizar la fusión, son los mismos que los utilizados para los fragmentos F1 y F3 del *cassette* SCA1.

De esta manera se logró obtener el *cassette* SCA2m a una concentración adecuada (ver tabla 1) con el que se procedió a la transformación. Se obtuvo un gran número de transformantes, los cuales mostraron un fenotipo similar a la cepa receptora  $\Delta azgA$ .

Se procedió a la extracción de ADN genómico de los transformantes con el objetivo de determinar la presencia o ausencia del *cassette* en el locus *azgA*. Si bien no

se obtuvo una amplificación que abarque las secuencias codificantes de la quimera en dicho locus, sí se logró amplificar el marcador de selección (riboB-AF), específicamente en el locus *azgA* y de manera independiente (figura 22).

Este resultado respalda la hipótesis de la integración parcial del *cassette*. Sin embargo, aún no se comprende por qué todos los transformantes obtenidos a partir de las transformaciones con SCA2m no son capaces de integrar completamente el *cassette*. No se descarta realizar ensayos de Southern blot que permitan aportar más información sobre cómo y dónde ocurre la integración del *cassette* en estos transformantes.

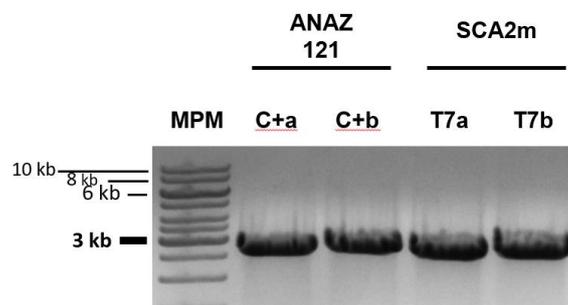


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la presencia del marcador de selección específicamente en el locus *azgA* (C+a, T7a) y de manera independiente (C+b, T7b).

## 4. Conclusiones y perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que se ha logrado diseñar y generar con éxito un *cassette* génico capaz de integrarse en el genoma de la cepa aceptora (MV 060) de *A. nidulans*. Además, el nuevo mutante generado, denominado MVD 2323, demuestra ser capaz de expresar sin inconvenientes la quimera correspondiente. Por otra parte, el añadido del extremo C-terminal de UreA en AzgA no afecta su funcionalidad, lo que evidencia la compatibilidad estructural de la modificación. Por último, dicha adición incrementa la sensibilidad de AzgA a la degradación inducida por  $\text{NH}_4^+$ , poniendo en evidencia la importancia de este dominio en la regulación negativa del transportador de UreA en respuesta a  $\text{NH}_4^+$ . Asimismo, este trabajo también podría estar indicando la independencia funcional del C-terminal de UreA, respecto al resto de la estructura proteica, descartando la posibilidad de la formación de un dominio tridimensional que involucre el C-terminal de UreA y otras regiones del transportador como bucles citosólicos.

Se pretende generar mutantes de la cepa generada en este trabajo de investigación (MVD 2323) que carezcan del adaptador proteico ArtA ( $\alpha$ -arrestina, factor en *trans*). Se espera revertir el fenotipo de internalización y degradación mostrado para AzgA-Ct.UreA-GFP. Por otro lado, también se estudiará la posibilidad de planificar una nueva estrategia para obtener el mutante portador de la quimera AzgA-Ct.UreA(m)-GFP (mutación en el motivo DEESE del C-terminal de UreA).

## 5. Materiales y métodos

### 5.1.1. Genotipo y fenotipo de cepas utilizadas

Tabla 2: Genotipo de cepas utilizadas

Cepa	Genotipo
MVD 001	<i>pabaA1</i>
P003	<i>pyroA4</i>
MVD 10A	<i>ureA::gfp::pyrGAf riboB2 pyrG89 pyroA4</i>
ANAZ 121	<i>azgA::gfp::riboBAF ΔazgA ΔuapA ΔuapC::pyrGAF pabaA1 riboB2 pyroA4 ΔnkuA::argB</i>
MV 060	<i>ΔazgA ΔuapA ΔuapC::pyrGAF pabaA1 riboB2 pyroA4 ΔnkuA::argB</i>
MVD 2323	<i>azgA::Ct-ureA::gfp::riboBAF ΔuapA ΔuapC::pyrGAF pabaA1 riboB2 pyroA4 ΔnkuA::argB</i>

Tabla 3: Descripción de los genotipos y fenotipos de las cepas utilizadas

<i>riboB2</i>	alelo del gen <i>riboB</i> que genera la auxotrofia para riboflavina.
<i>riboBAf</i>	alelo salvaje del gen <i>riboB</i> de la especie <i>Aspergillus fumigatus</i> .
<i>pyroA4</i>	alelo responsable de la auxotrofia para piridoxina.
<i>pabaA1</i>	alelo responsable de la auxotrofia para el ácido p-aminobenzoico.
<i>pyrG89</i>	alelo responsable de la auxotrofia para uridina y uracilo.
<i>pyrGAf</i>	alelo salvaje del gen <i>pyrG</i> de la especie <i>A. fumigatus</i> .
<i>argB</i>	alelo salvaje del gen <i>argB</i> (codifica para la enzima ornitil carboamil sintetasa, la cual cataliza la conversión de ornitina a citrulina, la precursora de arginina). Este fue utilizado como marcador de selección para deletar el gen <i>nkuA</i> cuando se generó la cepa correspondiente.
<i>nkuA</i>	alelo que participa en la recombinación no homóloga del ADN, por ende, participa en la reparación de roturas de doble hebra.
<i>azgA</i>	Alelo salvaje del gen <i>azgA</i> . Codifica para transportador de adenina-guanina-hipoxantina de <i>A. nidulans</i> . También es capaz de transportar 8-azaguanina (análogo tóxico de hipoxantina).
<i>ureA</i>	Alelo salvaje del gen <i>ureA</i> . Codifica para transportador de urea de <i>A. nidulans</i> . También es capaz de transportar tiourea (análogo tóxico de la urea).
<i>uapA</i>	Alelo salvaje del gen <i>uapA</i> . Codifica para el transportador de ácido úrico y xantina de <i>A. nidulans</i> . También es capaz de transportar análogos de estos.
<i>uapC</i>	Alelo salvaje del gen <i>uapC</i> . Codifica para el transportador de ácido úrico/xantina de <i>A. nidulans</i> (posee menor capacidad de transporte por estos sustratos que <i>UapA</i> ) A diferencia de <i>uapA</i> , es capaz de transportar

---

otras purinas como adenina, guanina e hipoxantina, aunque con baja capacidad de transporte.

---

NOTA:  $\Delta$ : Indicador de gen deletado. Los números asociados a cada gen indican una mutación con pérdida de funcionalidad.

## 5.2. Construcciones génicas

Para la generación de los *cassettes* génicos se emplearon las técnicas detalladas a continuación.

### 5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se empleó en todos los casos la enzima Kapa HiFi DNA Polymerase (Kapa Biosystems). La concentración de los reactivos utilizados y las condiciones de amplificación fue la siguiente (en un volumen final de 25  $\mu$ L): 300  $\mu$ M de dATP, dTTP, dCTP y dGTP; 300 nM de cada *primer* y ~500 ng de ADN genómico como molde. Para la Fusión-PCR se varió únicamente la concentración de *primers* a 400 nM y se utilizó ~25 ng de cada fragmento a fusionar.

### 5.2.2. Primers utilizados para la construcción de los *cassettes* génicos

Los primers fueron diseñados utilizando el software en línea “Primer3Plus” (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), el cual, a partir de una secuencia de interés y el tamaño deseado del fragmento a amplificar, genera una lista de cebadores recomendados. Posteriormente, se evaluó la calidad de los primers mediante el software “OligoAnalyzer” (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), considerando parámetros como el contenido de GC, la temperatura de *melting* ( $T_m$ ), y la formación potencial de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros en la reacción de amplificación. Las secuencias utilizadas para el diseño de los constructos fueron obtenidas de la base de datos “FungiDB” (<https://fungidb.org/fungidb/app>) y se presentan en el Anexo.

Tabla 4. *Primers* utilizados

Amplicón		Nombre	Secuencia (5'-3')
F1	Fw	5'UTR-azgA	TGCAGGTGAGTTTGCCTAG (20 nt)
	Rv	azgA-Ct-ureA	CTCCTACCCTCCCAGAGCGGTTTCTCCGTGACCTGTTCCCT (40 nt)
F2 y F2m	Fw	Ct-ureA	CCGCTCTGGGAGGGTAGGAG (20 nt)
	Rv	GFP-Rv	TTTGTATAGTTCATCCATGC (20 nt)
F3	Fw	GFP-STOP-Down-Fw	GCATGGATGAACTATACAAATAAACCGGTGCGCTCAAACA (40 nt)
	Rv	FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG (20 nt)
F1m *	Fw	5'UTR-azgA	TGCAGGTGAGTTTGCCTAG (20 nt)
	Rv	DEESE.E.A6-Rv	AGAAGCCGCTGCAGCCGAGCTCCCTGGCCTACCAGAGCA (40 nt)
F2m *	Fw	DEESE.E.A6-Fw	GAGCTGCGGCTGCAGCGGCTTCTGGGTCTGGTGCTGTAC (40 nt)
	Rv	FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG (20 nt)
SCA1 y SCA2m	Fw	5'UTR-azgA	TGCAGGTGAGTTTGCCTAG (20 nt)
	Rv	FP5AN3ZR2	CCAAGAGAATGCCAAACCAT (20 nt)
Locus <i>azgA</i>	Fw	azgA-seq1	GTGTGAGCTTCTGGAATGTC (20 nt)
	Rv	FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG (20 nt)
riboB-AF locus <i>azgA</i>	Fw	RiboBAfFw	AAGAGGCCGTTTCAGGAGTCT (20 nt)
	Rv	FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG (20 nt)
riboB-AF	Fw	RiboBAfFw	AAGAGGCCGTTTCAGGAGTCT (20 nt)
	Rv	RiboBAfRv	GCTGCAGAACCGTTACATGA (20 nt)
Secuenciación SCA1	Fw	azgA seq1	GTGTGAGCTTCTGGAATGTC (20 nt)
	Fw	azgA seq2	CCTCGGTTTGACTTTACTCG (20 nt)
	Fw	azgA seq3	GGCAGTGCTATGGCTTATGTAG (22 nt)
	Fw	SEC GFP	CTGTTACACCGAGCGAGAA (19 nt)

\*. Fragmentos obtenidos mediante mutagénesis dirigida, segunda estrategia utilizada para la obtención de SCA2m.

### 5.2.3. Mix PCR y programas de ciclado para la 1<sup>era</sup> ronda de PCR

#### 5.2.3.i. Mix PCR – fragmentos. (volumen final de reacción 25 µL)

	F1	F2/F2m	F3	F1m *	F2m *
H <sub>2</sub> O PCR	12,75 µL	15,25 µL	15,75 µL	12,75 µL	15,25 µL
Buffer KAPA (5X)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
dNTPs	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Primer Fw <sup>1</sup>	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
Primer Rv <sup>1</sup>	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
DMSO	2,5 µL	-	-	2,5 µL	-
ADNg	2 µL (cepa MVD 10A)	2 µL (cepa MVD 10A)	1,5µL (cepa ANAZ 121)	2 µL (cepa MVD 2323)	2 µL (cepa MVD 2323)
KAPA pol.	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL

<sup>1</sup>.ver tabla 4. \*. Segunda estrategia utilizada para la obtención de SCA2m (mutagénesis dirigida)

#### 5.2.3.ii. Programa de ciclado – fragmentos

F1				F2 y F2m			
	T °C	Tiempo	Ciclos		T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	98	20 <u>seg</u>		Desnaturalización	98	20 <u>seg</u>	
Hibridación	58	15 <u>seg</u>	25	Hibridación	61	15 <u>seg</u>	25
Extensión	72	3 min		Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1	Extensión final	72	5 min	1
F3				F1m *			
	T °C	Tiempo	Ciclos		T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	98	20 <u>seg</u>		Desnaturalización	98	20 <u>seg</u>	
Hibridación	59	15 <u>seg</u>	25	Hibridación	60	15 <u>seg</u>	25
Extensión	72	3:30 min		Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	5 min	1	Extensión final	72	5 min	1
F2m *							
	T °C	Tiempo	Ciclos		T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1				
Desnaturalización	98	20 <u>seg</u>					
Hibridación	61	15 <u>seg</u>	25				
Extensión	72	3 min					
Extensión final	72	5 min	1				

\*. Segunda estrategia utilizada para la obtención de SCA2m (mutagénesis dirigida)

#### 5.2.4. Mix PCR y programas de ciclado para la 2<sup>da</sup> ronda de PCR

##### 5.2.4.i. Mix PCR – Fusión (volumen final de reacción 25 µL)

	SCA1	SCA2m
H <sub>2</sub> O PCR	15,25 µL	15,35 µL
Buffer KAPA	5 µL	5 µL
dNTPs	0,75 µL	0,75 µL
5'UTR-azgA (Fw)	1 µL	1 µL
FP5AN3ZR2 (Rv)	1 µL	1 µL
F1	0,5 µL	-
F2	0,6 µL	-
F3	0,4 µL	-
F1m	-	0,6 µL
F2m	-	0,8 µL
KAPA pol.	0,5 µL	0,5 µL

##### 5.2.4.ii. Programa de ciclado – Fusión (SCA1 – SCA2m)

	T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	98	20 seg	10
Hibridación	65	15 seg	
Extensión	72	7 min	
Desnaturalización	98	20 seg	15
Hibridación	65	15 seg	
Extensión	72	7 min + 20 seg <sup>2</sup>	
Extensión final	72	7 min	1

<sup>2</sup>. Adición de 20 segundos por ciclo.

5.2.5. *Mix PCR y programas de ciclado para verificación de integración del cassette en locus azgA*

5.2.5.i. *Mix PCR – volumen final 25  $\mu$ L*

SCA1	
H2O PCR	12,75 $\mu$ L
Buffer KAPA	5 $\mu$ L
dNTPs	0,75 $\mu$ L
azgA-seq1 (Fw)	0,75 $\mu$ L
FP6AN3ZR1 (Rv)	0,75 $\mu$ L
DMSO	2,5 $\mu$ L
ADNg	2 $\mu$ L (Transformante correspondiente)
KAPA pol.	0,5 $\mu$ L

5.2.5.ii. *Programa de ciclado*

	T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	98	20 seg	
Hibridación	59	15 seg	30
Extensión	72	6 min	
Extensión final	72	5 min	1

5.2.6. *Mix PCR y programas de ciclado para verificar la presencia de RiboB-AF en locus azgA y de manera independiente*

5.2.6.i. *Mix PCR – volumen final 25  $\mu$ L*

H2O PCR	10,5 $\mu$ L
Fw	1 $\mu$ L
Rv	1 $\mu$ L
ADNg	1 $\mu$ L (Transformante correspondiente)
MyFi mix	12,5 $\mu$ L

5.2.6.ii. Programa de ciclado – *riboB-AF en locus azgA*

	T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	50 seg	
Hibridación	59	15 seg	30
Extensión	72	1:45 min	
Extensión final	72	2 min	1

5.2.6.iii. Programa de ciclado – *riboB-AF de manera independiente*

	T °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	50 seg	
Hibridación	59	15 seg	30
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	2 min	1

5.2.7. ADN genómicos utilizados como molde

Para la generación de cada fragmentos se utilizaron los ADNs genómicos de las cepas ANAZ 121 (generación de los fragmentos F1 y F3 del *cassette* SCA1), MVD 10A (generación del fragmento F2 del *cassette* SCA1), MVD A6 (generación del fragmento F2m) y MVD 2323 (generación mediante mutagénesis dirigida de los fragmentos F1m y F2m del *cassette* SCA2m).

5.2.8. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

### 5.2.9. Análisis electroforético de ácidos nucleicos

Los ADNs se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las muestras se sembraron en el gel con ayuda de un buffer de carga 6X (30 % glicerol, 0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xylencianol). Como referencia de peso molecular se emplearon los marcadores de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) y 1Kb plus DNA Ladder RTU (Bio-Helix) (figura 23). Las corridas se realizan aplicando un voltaje de 9 V/cm y el ADN se visualiza por exposición a luz UV de 302 nm.

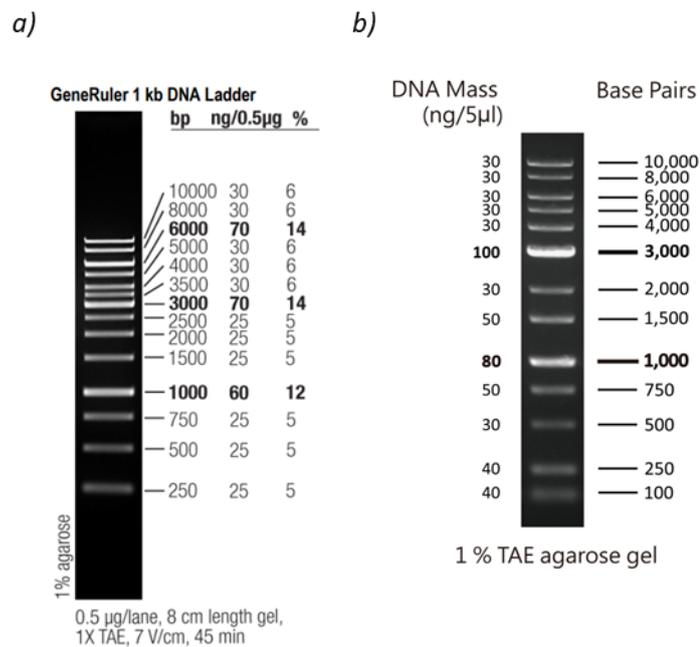


Figura 23. a) Marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific), b) Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder RTU (Bio-Helix).

### 5.2.10. Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Para la extracción y purificación de las bandas de ADN contenidas en los geles de agarosa, o para purificación directa de la reacción de PCR, se utilizaron los kits de purificación Monarch® DNA Gel Extraction Kit y Monarch® PCR and DNA Cleanup Kit (New England Biolabs), respectivamente.

### *5.2.11. Medios de cultivos*

Se utilizaron tanto medios de cultivo líquidos como sólidos, cambiando su densidad mediante el agregado de agar (1,3 o 3%).

#### *5.2.11.i. Medio mínimo (MM)*

- 20 mL de solución de sales
- 10 g de glucosa

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

Este medio no posee fuentes de nitrógeno, por lo que deben ser agregadas al igual que los suplementos nutricionales necesarios.

#### *5.2.11.ii. 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
- 2 g de peptona
- 1 g de extracto de levadura

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

*5.2.11.iii. Medio para la regeneración de protoplastos (isoosmótico)*

- 20 mL de solución de sales
- 10 g de glucosa
- 342.3 g de sacarosa

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

Este medio no posee fuentes de nitrógeno, por lo que deben ser agregadas al igual que los suplementos necesarios.

*5.2.11.iv. Solución de Sales*

- 26 gr de cloruro de potasio
- 26 gr de sulfato de magnesio heptahidratado
- 76 gr fosfato de potasio monobásico
- 50 mL de solución de elementos traza

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

*5.2.11.v. Solución de Elementos Traza*

- 40 mg de borato de sodio decahidratado
- 400 mg de sulfato de cobre pentahidratado
- 800 mg fosfato férrico dihidratado

- 800 mg molibdato de sodio dihidratado
- 800 mg sulfato de manganeso dihidratado
- 8 g de sulfato de zinc heptahidratado

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

#### 5.2.11.vi. *Solución de Vitaminas*

- 50 mg de tiamina-HCl
- 10 mg de biotina
- 100 mg de ácido nicotínico
- 200 mg de pantotenato de calcio
- 50 mg de piridoxina-HCl
- 100 mg de riboflavina
- 500 mg de ácido p-aminobenzóico

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

#### 5.2.11.vii. *Solución de Casaminoácidos*

- 150 g de caseína hidrolizada

Se lleva a un litro de agua destilada, y se esteriliza mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

### 5.2.11.viii. Suplementos nutricionales

SUPLEMENTO	CONCENTRACIÓN
Amonio	9.2 g / 100 mL (100X)
Nitrato de sodio	8.5 g / 100 mL (100X)
Prolina	5.75 g / 100 mL (100X)
Uracilo	6.1 g / 100 mL (50X)
Uridina	5.6 g / 100 mL (50X)
Riboflavina	25 mg / 100 mL (100X)
Piridoxina-HCl	500 mg / 100 mL (100X)
Ácido p-aminobenzoico	20 mg / 100 mL (100X)
Hipoxantina	0,1 mg/mL
Ácido úrico	0,1 mg/mL

Se esterilizan mediante calor húmedo a 121°C durante 20 minutos, y se conservan a 4°C.

### 5.2.12. Condiciones de cultivo

Para la formación de una colonia compacta que permita visualizar las características fenotípicas se debe inocular esporas de manera puntual sobre un medio sólido (1,3% agar) y dejar crecer durante 48-72 horas a 37°C. Si se quiere obtener una placa completamente crecida se realiza un estriado de esporas sobre toda la placa y se deja crecer durante 48-72 horas a 37°C. Este tipo de crecimiento usualmente se utiliza para el raspado de esporas (para la preparación de suspensiones de esporas), con lo cual dicho crecimiento se realiza en medio de cultivo con agar 3%.

### **5.3. Técnicas empleadas en *A. nidulans***

#### *5.3.1. Transformación en *Aspergillus nidulans**

El protocolo de transformación empleado fue adaptado de (Koukaki et al., 2003).

##### *5.3.1.i. Protoplastización y transformación*

Se parte de un cultivo de la cepa a transformar, realizado en placas de medio completo 3% durante aproximadamente 72 horas, asegurando un crecimiento adecuado para el raspado de esporas. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas mediante raspado, en 10 mL de solución de Tween 80 al 0,01%, filtrando a través de blutex para separar las esporas de los restos de micelio. La suspensión se realizó un día antes de la transformación refrigerándola a 4 °C hasta su uso. Antes de iniciar el protocolo, se observó el tamaño inicial de las esporas bajo el microscopio para establecer un punto de referencia.

Se inocularon las esporas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio mínimo suplementado con amonio y demás suplementos nutricionales. La incubación se realizó a 37 °C y 130 r.p.m en agitador orbital durante 3-5 horas, monitoreando periódicamente el desarrollo de tubos germinativos por microscopia. A las 3-5 horas, se verificó bajo el microscopio la presencia de tubos germinativos en el 5-10% de las esporas. Una vez alcanzado este punto, la incubación se detuvo, y el cultivo se transfirió a tres tubos Falcon estériles. Los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a 10°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta p5000 y los pellets se resuspendieron colectivamente en 20 mL de solución I, para luego ser transferidos a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL. A continuación, se adiciona 1 g de Vinotaste Pro (Novozymes®) como enzima lítica para remover la pared celular y liberar los protoplastos. La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos y luego a 30°C y 60 rpm por 1 hora y 45 minutos en agitador orbital.

Tras la digestión enzimática, los protoplastos se concentraron mediante centrifugación a 3000 g por 10 minutos en un tubo Falcon estéril. Se descartó el sobrenadante con la pipeta p5000, y los *pellets* se lavaron con 10 mL de solución II, repitiendo la centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en 4 mL de solución II con pipeta p1000 y posteriormente se les añadió 1 mL de solución III, asegurando la homogenización antes de proceder.

Los protoplastos se distribuyeron en alícuotas de 300 µL en tubos de Eppendorf, y se añadió el cassette génico de interés en una concentración final de 1 µg a una de las alícuotas. En el control negativo y de viabilidad se añadió H<sub>2</sub>O mQ estéril en lugar del *cassette* génico. Las alícuotas de protoplasto no utilizadas se almacenaron a -80°C. Las alícuotas utilizadas para la transformación (*cassette*, control negativo y control de viabilidad) se incubaron en hielo por 15 minutos, se adicionó 1 mL de solución III, y tras una nueva mezcla, se dejaron a temperatura ambiente otros 15 minutos. Luego, se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos, descartando el sobrenadante, y se lavaron los *pellets* con 1 mL de solución II. Finalmente, se resuspendieron cuidadosamente en 200 µL de solución II.

Los protoplastos resuspendidos fueron transferidos a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de top agar (a una temperatura de 45-55°C) suplementado con fuente de nitrógeno y demás suplementos necesarios. La mezcla se esparció sobre placas selectivas (para el caso del control negativo y la transformación de interés) y no selectivas (control viabilidad) previamente preparadas, dejándose polimerizar. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C (3-5 días) hasta observar presencia de transformantes.

#### Soluciones de transformación:

Solución I: 1,2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM ortofosfato pH 5,8.

Solución II: 1 M de sorbitol, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Solución III: 60% p/v PEG 6000, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

TOP agar (1L): 20 mL solución de sales, 10g glucosa, 342,3 g sacarosa, 4,5 g de agar. Se ajusta pH a 6,8 antes de agregar el agar.

### 5.3.1.ii. *Purificación y selección de transformantes*

Una vez se obtuvieron transformantes primarios, debieron someterse a rondas de purificación y selección. Para ello se prepararon suspensiones de esporas a partir de los transformantes primarios y se plaquearon en medios selectivos. Estos fueron incubados a 37 °C por 48-72 horas hasta observar un crecimiento de colonias aisladas, a partir de las cuales se procedió a generar una “placa madre”. A partir de esta se realizaron réplicas para analizar las auxotrofías mediante ensayos de crecimiento en placa.

### 5.3.2. *Extracción y purificación de ADN genómico de A. nidulans*

Se inocularon 100 mL de MM líquido (con los suplementos nutricionales necesarios), con una suspensión de esporas colectada de una placa de conidias de la cepa en cuestión en 7.5 mL de 0.01% Tween 80. Se incubó hasta el día siguiente (“Overnight”, O.N) a 37 °C a 140 r.p.m para luego filtrar el cultivo sobre blutex, lavando el micelio con agua estéril y secándolo bien entre hojas de papel estériles. El micelio obtenido se congeló con nitrógeno líquido y se molió con mortero hasta obtener un polvo blanco. Se agregó 800 µL de solución de extracción de ADN por cada 200 mg de micelio molido y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. El ADN se extrajo primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 11.600g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% en presencia de 0.3 M de Acetato de Sodio (AcNa) y se centrifugó por 10 minutos a 11.600g. El precipitado se lavó con EtOH 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de buffer Tris-EDTA 10:1. Finalmente se incubó por 30 minutos en baño de agua a 37 °C con RNAsa 10 µg/mL final.

#### Soluciones utilizadas:

Solución de extracción: 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 1 % SDS, 1 mM EDTA.

Buffer Tris-EDTA (TE) 10-1: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.

### 5.3.3. Microscopía de epifluorescencia

El análisis de la expresión y localización subcelular de quimeras fluorescentes en *Aspergillus nidulans* se realizó mediante microscopía de epifluorescencia. El protocolo utilizado fue diseñado para preservar la integridad celular y optimizar la visualización. Las cepas se cultivaron directamente en placas de Petri con fondo de vidrio estériles (“Glass Bottom Dishes”), que permiten la observación directa sin necesidad de montar las muestras en portaobjetos. Este método garantiza que las células permanezcan en su medio de cultivo, evitando deshidratación o muerte celular, factores comunes en técnicas de montaje convencionales.

Como condición de cultivo inicial se hizo uso de un medio mínimo (MM) suplementado con 0,1 % de glucosa para ralentizar el crecimiento y facilitar la observación. Dicho medio se preparó y esterilizó sin sales de fosfato (ya que estas precipitan durante el autoclavado, y la precipitación de las mismas dificulta la observación al microscopio). Previo a su uso se añadió  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a una concentración final de 25 mM.

Se prepararon suspensiones de esporas con micelio joven (región inmediata a la zona blanca de las colonias) en 400  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 0,01% visualizando una coloración suave del color de las cepas en cuestión y se inocularon 3  $\mu\text{L}$  en 3 mL de MM 0,1% glucosa con el agregado de 10 mM nitrato y suplementos necesarios (medio no represor). La incubación se llevó a cabo a 25 °C durante 16 horas. Pasadas las 16 horas se realizó la represión de las cepas en cuestión, cambiando el medio no represor por medio mínimo con 10 mM amonio y otros suplementos necesarios (medio represor). Previo al cambio de medio se realizó un lavado con 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  mQ estéril.

Las muestras fueron observadas y fotografiadas con el microscopio invertido Olympus CKX31 perteneciente a la Unidad de Bioimagenología avanzada del Institut Pasteur de Montevideo con un filtro U-MNIBA3. El microscopio está equipado con una cámara Hamamatsu Orca Er y usa el software Micro-Manager (<https://micro-manager.org/>) para procesamiento de imágenes. Se visualizó con un aumento objetivo 100X.

El procesamiento de las imágenes incluyó la aplicación de colores falsos mediante ImageJ. En ImageJ, se seleccionaron paletas de colores específicas (verde para GFP). Además, se realizó la combinación (“merge”) de imágenes de campo claro y fluorescencia ajustando la opacidad. Los parámetros de brillo y contraste se mantuvieron constantes en todas las imágenes para garantizar la comparabilidad entre las muestras.

#### *5.3.4. Western Blot*

##### *5.3.4.i. Extracción de proteínas*

Se inocularon 200 mL de medio mínimo líquido con una suspensión de esporas obtenida de una placa de cultivo de las cepas a analizar. Las cepas se crecieron a 32°C y con una agitación de 140 r.p.m. en nitrato (5 mM) como fuente de nitrógeno. Para el estímulo de degradación se añadió 10 mM de tartrato de amonio y se incubó en las mismas condiciones por 2 horas. El micelio resultante fue recolectado y molido en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente, se transfirieron aproximadamente 200-300 µL del micelio molido a tubos de 2 mL. El micelio se resuspendió en 1 mL de Buffer de Precipitación. La suspensión fue incubada en hielo durante 10 minutos. Después de la incubación, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante fue removido cuidadosamente, y los pellet se resuspendieron en 1 mL de etanol 100% helado. Se centrifugó nuevamente a 13000 r.p.m a 4°C durante 5 minutos.

Los pellets fueron lavados dos veces con 1 mL de acetona helada. Para confirmar la ausencia de ácido tricloroacético (TCA), se mezclaron restos del sobrenadante con azul de bromofenol; la ausencia de un cambio de color a amarillo indicó la completa eliminación del TCA. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire a 60°C en bloque térmico hasta que se visualizaron grietas y el material adquirió un color blancuzco (aproximadamente 35-40 minutos).

Los pellets secos se resuspendieron en 400-500 µL de Buffer de Extracción previamente suplementado con inhibidor de proteasas. La mezcla se incubó durante 15 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 15 minutos,

para posteriormente recolectar los sobrenadantes. Finalmente, el sobrenadante se sometió a una centrifugación adicional para eliminar restos de residuos.

#### Soluciones utilizadas:

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 para hongos (Sigma-Aldrich P8215, dilución 1:500).

#### *5.3.4.ii. Dosificación de proteínas mediante método BCA*

La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones 1:10 de los extractos proteicos y del Buffer de Extracción (utilizado como blanco) en agua destilada para las mediciones. Para la curva de calibración, se empleó albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones finales de 0, 0.025, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5 y 2 mg/mL. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 562 nm utilizando un lector de placas.

#### *5.3.4.iii. SDS-PAGE*

Se mezclaron 50 µg de cada extracto proteico con Buffer de Carga SDS 4X y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se sembraron en un gel SDS-PAGE al 10%. Se incluyeron 5 µL de un marcador de peso molecular (Thermo Scientific PageRuler Plus, figura 24) pre-teñido para facilitar la identificación de bandas. La electroforesis se llevó a cabo hasta que el Azul de Bromofenol del Buffer de Carga alcanzó el extremo del gel.

Soluciones utilizadas:

Buffer de carga SDS (4X): 250 mM Tris-HCl 6.8, 12% SDS, 40 % Glicerol, 20 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.02 % Azul de Bromofenol.

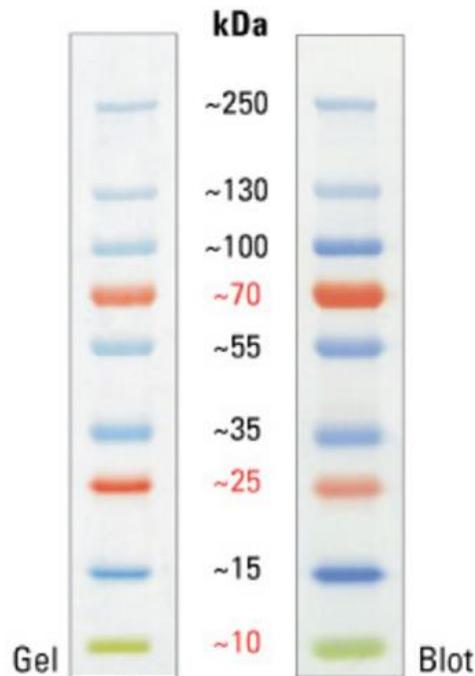


Figura 24. Marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus.

5.3.4.iv. *Transferencia*

Tras la separación en SDS-PAGE, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific). Tanto el gel como los materiales de transferencia se sumergieron en Buffer de Transferencia frío antes de ensamblar el dispositivo de transferencia. La transferencia se realizó a 120 V durante 1 hora.

Soluciones utilizadas:

Buffer de Transferencia (1 L): Tris Base 3.02 g, Glicina 14.42 g, EtOH 95% 200 mL, SDS 10% 3,7 mL, H<sub>2</sub>O mRo, c.s.p. 1 L.

#### 5.3.4.v. Tinción Ponceau

Como control de carga se realizó una tinción Ponceau, incubando la membrana en Ponceau con agitación por 10 minutos. Posteriormente se enjuagó la membrana con H<sub>2</sub>O mRo hasta lograr identificar todas las bandas proteicas presentes en la membrana. Una vez es verificado el control de carga se procede a retirar el Ponceau enjuagando nuevamente con H<sub>2</sub>O mRo hasta no ver rastros de la tinta.

Solución Ponceau: 0,1% Ponceau, 5% ácido acético.

#### 5.3.4.vi. Bloqueo

El bloqueo se realizó con leche descremada en polvo al 5% en TBST, incubando por 1 hora a temperatura ambiente.

Soluciones utilizadas:

TBST (Buffer de Lavado): 1 M Tris-HCl pH 7.5 20 mL, NaCl 5 M 30 mL, Tween 20 1 mL, H<sub>2</sub>O c.s.p 1 L.

#### 5.3.4.vii. Revelado

La membrana fue incubada con una dilución 1:2500 de anticuerpo primario  $\alpha$ -GFP (ratón, Roche) en 3% BSA TBST, durante 2 horas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBST. A continuación, la membrana fue incubada por 1 hora con una dilución 1:2000 de anticuerpo secundario  $\alpha$ -Fc ratón (conejo, Invitrogen) conjugado a peroxidasa en solución de bloqueo, durante 2 horas. Luego se realizaron otros 6 lavados de 5 minutos con TBST. El revelado se realizó utilizando el kit HRP Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen), y las imágenes se adquirieron en el sistema G-BOX disponible en el laboratorio.

## 6. Bibliografía

- Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S., & Ramon, A. (2010). UreA, the major urea/H<sup>+</sup> symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 47(12), 1023–1033. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2010.07.004>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell* (Garland Science, Ed.; 6th ed.).
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 765–774. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2001.5087>
- Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Peñalva, M. A., Scazzocchio, C., & Sophianopoulou, V. (2009). AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryotic Cell*, 8(3), 339–352. <https://doi.org/10.1128/EC.00270-08>
- 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>
- Barata-Antunes, C., Alves, R., Talaia, G., Casal, M., Gerós, H., Mans, R., & Paiva, S. (2021). Endocytosis of nutrient transporters in fungi: The ART of connecting signaling and trafficking. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1713. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2021.03.013>
- Belgareh-Touzé, N., Léon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D., & Haguenaer-Tsapis, R. (2008). Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 5), 791–796. <https://doi.org/10.1042/BST0360791>
- Bogdanov, M. (2023). The power and challenge of lipid (a)symmetry across the membrane and cell. *Emerging Topics in Life Sciences*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1042/ETLS20220088>
- Caddick, M. X. (1994). Nitrogen metabolite repression. *Prog Ind Microbiol*, 323–353.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3132–3141. <https://doi.org/10.1074/JBC.M308826200>
- 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*, 366(6). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNZ066>

- Czuba, L. C., Hillgren, K. M., & Swaan, P. W. (2018). Post-translational Modifications of Transporters. *Pharmacology & Therapeutics*, *192*, 88. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.06.013>
- 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), 937–940. <https://doi.org/10.1128/JB.93.3.937-940.1967>
- Diallinas, G. (2013). Allopurinol and xanthine use different translocation mechanisms and trajectories in the fungal UapA transporter. *Biochimie*, *95*(9), 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2013.05.013>
- Diallinas, G. (2014). Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Frontiers in Pharmacology*, *5*, 207. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00207>
- Diallinas, G., & Scazzocchio, C. (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. *Genetics*, *122*(2), 341–350. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/122.2.341>
- El-Gebali, S., Bentz, S., Hediger, M. A., & Anderle, P. (2013). Solute carriers (SLCs) in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 719–734. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.12.007>
- Felenbok, B., Flipphi, M., & Nikolaev, I. (2001). Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *69*, 149–204. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)69047-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)69047-0)
- Frandsen, R. J. N., Khorsand-Jamal, P., Kongstad, K. T., Nafisi, M., Kannangara, R. M., Staerk, D., Okkels, F. T., Binderup, K., Madsen, B., Møller, B. L., Thrane, U., & Mortensen, U. H. (2018). Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30816-9>
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S. I., Baştürkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., ... Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, *438*(7071), 1105–1115. <https://doi.org/10.1038/NATURE04341>
- Goldman, G. H., & Kafer, E. (2004). *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology*, *41*(4), 428–442. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.12.001>
- 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>
- Jung, H. (2002). The sodium/substrate symporter family: Structural and functional features. *FEBS Letters*, *529*(1), 73–77. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03184-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03184-8)
- Karachaliou, M., Amillis, S., Evangelinos, M., Kokotos, A. C., Yalilis, 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>
- Kinghorn, J. R., Sloan, J., Kana'n, G. J. M., DaSilva, E. R., Rouch, D. A., & Unkles, S. E. (2005). Missense mutations that inactivate the *Aspergillus nidulans* nrtA gene encoding a high-affinity nitrate transporter. *Genetics*, 169(3), 1369–1377. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.104.036590>
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 5), 937–953. <https://doi.org/10.1042/BST0370937>
- Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A., & Diallinas, G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 687–695. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00208-2)
- 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>
- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., & André, B. (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 196–204. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2010.01.004>
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., & Heitman, J. (2010). The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(2), 298–340. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-10>
- Lin, C. H., MacGurn, J. A., Chu, T., Stefan, C. J., & Emr, S. D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*, 135(4), 714–725. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.09.025>
- Liu, L. H., Ludewig, U., Frommer, W. B., & Von Wirén, N. (2003). AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H<sup>+</sup> symporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(3), 790–800. <https://doi.org/10.1105/TPC.007120>
- MacGurn, J. A., Hsu, P. C., & Emr, S. D. (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 231–259. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060210-093619>
- Marín, I. (2018). Origin and evolution of fungal HECT ubiquitin ligases. *Scientific Reports*, 8(1), 6419. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-24914-X>
- Meintanis, C., Karagouni, A. D., & Diallinas, G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Molecular Membrane Biology*, 17(1), 47–57. <https://doi.org/10.1080/096876800294489>
- Mikros, E., & Diallinas, G. (2019). Tales of tails in transporters. *Open Biology*, 9(6), 190083. <https://doi.org/10.1098/RSOB.190083>
- Nagy, V., & Dikic, I. (2010). Ubiquitin ligase complexes: from substrate selectivity to conjugational specificity. *Biological Chemistry*, 391(2–3), 163–169. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.021>

- Nikko, E., & Pelham, H. R. B. (2009). Arrestin-Mediated Endocytosis of Yeast Plasma Membrane Transporters. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(12), 1856. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2009.00990.X>
- Oakley, B. R., Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., & Osmani, S. A. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, *1*(6), 3111–3120. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.405>
- 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 : FG & B*, *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>
- Pateman, J. A., Dunn, E., & Mackay, E. M. (1982). Urea and thiourea transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Genetics*, *20*(7–8), 777–790. <https://doi.org/10.1007/BF00483973>
- 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>
- Pizzagalli, M. D., Bensimon, A., & Superti-Furga, G. (2020). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The Febs Journal*, *288*(9), 2784. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15531>
- Pogozheva, I. D., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2014). Life at the border: adaptation of proteins to anisotropic membrane environment. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *23*(9), 1165–1196. <https://doi.org/10.1002/PRO.2508>
- Risinger, A. L., & Kaiser, C. A. (2008). Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(7), 2962–2972. <https://doi.org/10.1091/MBC.E07-06-0627>
- Saha, S. (2020). Association between the membrane transporter proteins and type 2 diabetes mellitus. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *13*(3), 287–297. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1729125>
- Saier, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *64*(2), 354–411. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000>
- Sanguinetti, M., Amillis, S., Pantano, S., Scazzocchio, C., & Ramón, A. (2014). Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H<sup>+</sup> transporters in fungi and plants. *Open Biology*, *4*(6). <https://doi.org/10.1098/RSOB.140070>
- Sanguinetti, M., Silva Santos, L. H., Dourron, J., Alamón, C., Idiarte, J., Amillis, S., Pantano, S., & Ramón, A. (2022). Substrate Recognition Properties from an Intermediate Structural State of the UreA Transporter. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS232416039>

- Sano, M. (2023). A Role of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 in Cardiorenal Anemia Iron Deficiency Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS24065983>
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 29889–29894. <https://doi.org/10.1074/JBC.M404399200>
- Tavoularis, S. N., Tazebay, U. H., Diallinas, G., Sideridou, M., Rosa, A., Scazzocchio, C., & Sophianopoulou, V. (2003). Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology*, 20(4), 285–297. <https://doi.org/10.1080/0968768031000106339>
- 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 : FG & B*, 33(2), 115–125. <https://doi.org/10.1006/FGBI.2001.1280>
- Tazebay, U., Sophianopoulou, V., Rosa, A., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (1994). Structure-function analysis of the proline permease (PRNB) of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 39(6), 551–551. <https://doi.org/10.1007/BF02814103>
- 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>
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 112. <https://doi.org/10.1038/NRM2330>
- 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>
- Wright, E. M., Loo, D. D. F., Hirayama, B. A., & Turk, E. (2004). Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19(6), 370–376. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00026.2004>
- Yan, Q. (2003). Pharmacogenomics of membrane transporters an overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 227, 1–20. <https://doi.org/10.1385/1-59259-387-9:1>
- Zhang, J., Wang, H., Fan, Y., Yu, Z., & You, G. (2021). Regulation of organic anion transporters: Role in physiology, pathophysiology, and drug elimination. *Pharmacology & Therapeutics*, 217. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107647>

## ANEXO

### *Secuencias genómicas de cepas receptoras y transformantes*

#### SECUENCIA GENOMICA MVD2323

5'UTR-azgA::azgA::Ct-ureA::linker::GFP::terminador::riboBAf::3'UTR-azgA

AGGTTTCGCGAGGGATCATGCTTGACCCCGCAGTCTGGGGTATGCGTAGTACGAC  
AGTCACGAGCGGAGGACTGCATGCGCCTCGATCGTTGTAGACCATTCTGATTGATT  
GAATCTGCAGGTGAGTTTGGCGTAGCAATGGATCTAGCTTGGCTTGTAAAGATACA  
ATAATAGAAGTCGATAAGCCTGCGAACGGCTTCGGCCTTCGCCGCCAGCCCCATA  
GTGATCGGAGGTTGCAGAAGGCGTGCTTGGTTTTGTGCTATGATAGTAGGTTGTC  
AGGTGTTTATGAACTGCTAGGCCTAGGCGGATATCACTCTTAGCGCGGCGACAGG  
GCGTCTAGCGGGCCCAAGGACCCAGCGCAGAGGGCGGTTCCGCGTCAATGTCGG  
CAGATGGCGGATGCTGGGAGAAACGAGCATACTCAGAGTACATTTTGTGGATCGT  
ATACCCAGGTGGAGATGGCAGCTCATGGAGCTGCCATCTCCAATGACGAAATCATG  
AAGGCACAGCTAGGTGAAGCTGACAGTAATTTGCCTCCCGTAAGACGAATTAGTCG  
ATGATAAGCAACGGCCTGATACGTTACCCGGGGAGATCCGCCAGCGTACGCACTT  
TGGAGATGAACGCTGGCAGATGACTCGCGGGCTCAGGGACTCGTCCCGTGGATA  
ACTCGGCCAGTGAGGCCCTTCGAGCCTATCGCAGACGGTCCCACTCGATCCTGAA  
TTACTGGTCTCGGCAATCTGGGCACATGGCAGAGATAAGGAATTTTTTTTGGCCC  
AGTGGACGGTCGGGAAATAAAATCTCTAGCGCGCTGTCGTGTGAGCTTCTGGAAT  
GTCGTTTCTGCAGGCTGAGTCTCATCTTGACGCCCATTTCCCTATCCCAACGGCT  
TAGCCGGTTCGTCTTTGCACCTCCTATTTGACCTCACAGACAGCATGGGGTACGCT  
GAGTGGATTGGCCGTACCAATGCGGCCGTGGCTCGTAGCCCGGTCGGTTCGCTGG  
TTTCGCTTGGAGGGGTCCGGTCATGTATGTCTTTGAGCGCTCGTAGAGCGTTGTC  
CTTCTCTGGACTGCTCGCTGTATGCGAGCCTGGGAATAAATCCTTCTCACTAATTC  
GCGCTGTCCTTCAGCCCCGCGAGCGAAAAGGCGCGTACTTCTTCACCGAATTGCG  
TGCCGGCCTTGCCACCTTCTTCGCTATGGCCTACATTATTTCCGTGAACGCCAATAT  
CACGAGGTACGTACCGTTATGAGGAGCGACATGCGCCAACGAGAAAATCGACTG  
GAGGTGCTGACGAGAACGTCTGTTCAGTGATACAGGAGGAACATGTGTCTGTCCA  
GCCGAAGACCTCGCAACGGCGTGCGACAACAACACCGAGTACCTCCTATGCAAG  
CAGGAGGTTAACCGTGATCTGGTGAAGTGAACGCGGCGATCGCCGCCATTGCG  
AGCTTCTTCCTCGGTCTTCTCGGAATCTGCCCGTTCGCTCTGGCCCCGGGAATGG  
GTCTCAACGCGTACTTTGCCTATACTGTCGTTGGTTCATCATGGTACCGGATTGATCC  
CCTACAGTCTTGCAAGTACTGCGGTTTTCGTCGAGGGCTGGATTTTCTCGGTTT  
GACTTTACTCGGTATCCGGCAGTGGCTTGTCTCGTCCATTCCCGCCTCGATTAAC  
TCGCGACCGGCGCCGGTATTGGATTGTACCTGACGCTGATCGGTCTCAGCTATAGT  
GCCGGTCTTGGAGTTGTGCAGGGGGGTACAAGCAGCCCTATTAGTTAGCCGGCT  
GCGCGTCAGATACGTTCCGGCGACGACGGGTTGTGTCCTTCGTCCGAAAAAATGCG  
CAATCCCACAATGTGGATTGGTATCTTTTGGCGGGTGTTTTCACTGTCTTCTTGAT  
GATGTATAGGGTCAAGGGTGCAGTGATTGCTGGTATCCTGCTTGTCTCGATCATCT  
CATGGCCGCGTCCGACCCAGTTACCTATTTCCCCACACAGAAACCGGTGACAG  
CTCGTTTGTATTTCTTCAAGAAAGTCGTACCTTCCATCCGATTCAGCATACTCTGGT  
GGCGCAGGAATGGAATATCTCCAGTAATGGTGGACAGTTTGGCCTCGCATTGATCA  
CGTTCTTGATATGCTATCTAGCTCGTCCGGTATATACAGAGCCCTGCTAACTGGGAT  
AGTACGTTCGACATTCTCGACGCTACGGGTACATTATACTCAATGGCCAAGTTTGTCT

GGCGCCATGGACGAGCGCACCCAGGATTTTGAAGGCAGTGCTATGGCTTATGTAG  
GCCTCTCACACCCTCTCGTGAAAACATCGCTAACTATAGTAGATGGTTCGACGCAA  
TCTGCATTTCCATCGGTTCTTTGTTTCGGTTCTCCGCCTGTTACAGCATTTCGTCGAG  
AGCGGTGCTGGTATTTTCGGAAGGTGGAAAGACCGGTCTGACATCATGTATGACCG  
GTATCTGCTTCTTCATCGCCGTCTTCTTTGCGCCTATCTTCGCCTCGATTCTCCAT  
GGGCCACTGGCAGTACATTGGTCATTGTTCGGCTCCATGATGATGCATGCGACACTC  
GAGATCAACTGGCGGTATCTTGGAGACGCGGTTCCCGCGTTCTTGACGATTTTCGC  
TCATGCCATTCACCTACAGCATTGCCGACGGCCTGATCGCCGGTATCTTGAGCTAC  
ATCCTCATCAACGGAGGTGTGTGGATTGTTGCCAAGTTGACTGGAGGCCGGATTT  
CTCCTCCTAACC GCGAGGAGGAGCACGAGCCGTGGACCTGGAAAATCCCAGGAG  
GATTTTTCCCGCCATGGCTGGTGC GTGCGTTTCATGGGAAGAAGGACTTCTGGCG  
GGCTGAAGATGATGCCAATGATCTTAGCCTTGGCGTCATGCCTCACGGGTCGCTC  
TCGTGCGCAGGATCGCGCGGGCGAGAACTTGCATCCTCAAAGGAACAGGTCACG  
GAGAAACCGCTCTGGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAGGGTTGGTAAGCTTATGC  
TGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAGCAGTGCTCTGGTAGGCCAGGGAG  
ACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGCTGTTACACCGAGCGAGAAGATTGT  
TGCAAAA GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCC AGTAAAGGAGAAGA  
ACTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGTAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAA  
ATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTA  
AATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTT  
CACCTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTT  
CTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAA  
GACGACGGGAAC TACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCCTC  
GTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAAACATCCTCG  
GCCACAAGTTGGAATACAACTACAACCTCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAG  
CAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCG  
GCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTC  
CTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTCGAAAGATCCCAAC  
GAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACA  
TGGCATGGATGAACTATACAAA TAACCGGTC GCCTCAAACAATGCTCTTCACCCT  
CTTCGCGGGTCTGAAATACCCTCACCTGGCAACAGCAATTGGCGCTTCATGGCTG  
TTTTTCCGATCTCTACTTGTACGGCTATGTGTA CTGCGGGTAAGCCACAAGGCAA  
GGGCAGATTGCTGGGAGGTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTG  
AGTGTGTTTGGTGTGGCCAAAGACATGATCTTACTGA AAGAGGCCGTTTCAGGAG  
TCTGGCTCGTTTGATCACATGGGATTA AATATGGTGTGAGGCTGGGATATTTAT  
GTTTTGTCTTTCGCTTCGATATCAACAGATTGACAATAATGAATAACTATCTACGG  
ACTATGAATGCAGCTCGATCTACTCCG TATTAGTCGGGCAATCTCCCGTAGAAGAT  
GCTAGACTGCGCTGAAAGACTAGGCACAGTTAATTGCCGCGGATCACGTCAGGCC  
TGACAAATGACAGGTGGACCTTCATGTAATCGCACGATGAGTCAGCGCCTCTTCTC  
CCCCGCCGACTTGCAGCTGCGGATGTCCC GAGGAGCCGAACATTGAATCTATCCC  
AAGAGTGACTGAAATATGATTGCAATCGTCGTCTTTTTCTTGCAGAGAATGTGGTGA  
GGTGATCAATCGTGTTTTTCTTCATATATTATATTCTGTAATGATCATACTTTGTTGAG  
ATACCCGTCTCTAAAATTGACTTTTCGCCTCCCTCCTCCCTCTCAAGTCCGTCATCG  
CAATGTCGAATTTACCGTCCCATGCTTCTCCGTCTTTGGGGCGCAAACGCCTACC  
ACGCCGAGCCCGTTCGACGAGCTTTCTCTCAAGTCGAACATCACATCAGCCCCTG  
CGTTACTACTCCAGATTAGACGAACTCCGAGATGAGACTTCCAGCCAGATCAGCAG  
CATAGACTGACCGCGGGGACATGACCCCTGCGGTTCCCGCATCATTACTCTCC  
CCATCCTTCACTCCTCCAGCAACCCCGGGGGCTCGATCAATACCGCGGAGCTGC  
TTCAACAGACCCAATTAGCTGGCGCACGGCAAGGGTCAACACATACTAAGCCCCC  
GAGGTTGCTTTCTCGTCTTCCCAATGTGCAATGTATCGTCCGCGCTCGGATACCCA  
CGACAAC TGGCGCGGAGATGTTTCTTCACTGTACCACAATGACTTAGACAACAAA

GAGCATTGGCGATTGTGTTTGGAAATACAATTCGAAGCAGAAGCTTGGACAAGAT  
CCGGCCTGGAGAGACGGAGATGGATCGCATGATCCGTGGCGCGTATGTCGGGAA  
ACTCCGACCGGGCCGTGTGAGCAGCTGGTATGACGAGGAGAAAGCTGAAGAGGC  
CGCCAGTCCGGAAGCTGGCGGCGCTGTATCCAGTCCGCACACACTGCCGCGAAG  
TAGCCTCAAGGAGGCACCTCTTGTGAGAATCCATTCCGAGTGCTACACTGGTGAG  
ACGGCTTGGTCTGCACGCTGCGACTGCGGCGAGCAGCTCGATGAAGCAGCTCGC  
CTCATGTCGCTGCCTATGGAAACGTTGGCAGAGGCTGCGTACCAGCCGGATGGG  
GCGGTACCGTCAAATGCTGCTGGAGGTGTAATTGTGTACCTGCGCCAAGAAGGAC  
GAGGCATTGGGCTGGGCGAGAACTGAAAGCGTACAATCTTCAGGATCTGGGATC  
AGACACGGTGAAGCCAATCTCCTGCTTCGCCACCCTGCGGATGCAAGAAGTTAT  
GGATTAGCTACGGCGATCCTGGTGGATCTTGGTCTAGGGATTGACTCGAATCCGCA  
CGGCATCCGACTACTCACGAATAACCCGGACAAGATTCGAGCGGTTGAGGGACCC  
AACCGAGAAGTGGTGGTGAAGAGCGGGTGCCGATGGTGCCATTGGCATGGAGA  
TCGGGTGAAGATGGGAATCAAGAGTTCGAGGTCGAAGGGTATCTGAGAACGA  
AGGTATGTCGACAATCTATCTCTTGAAGCTAGCTTATTTTCTCATCATTCTTAAACA  
ATGTCTCACTCTCTCCTCGCAGATATCGAAAATGGGCCATTTGCTCCAATGAACCTA  
TCCCCTTCGGTTAGTAACCTTGTGCTGGAAGTACGCCTTCCTGCTTTTGGACTTA  
GCCAAGTCGACACGGTGTATGCTCGTCACTCATGTAACGGTTCTGCAGCCCAA  
CGTGACCGGTATAGTATAGACAGATGGAGGAACCTAATTTATTTCAGAGAGCGAACG  
AAAGACGTTCTCCAATATGTATAATTGTTATAGCGCATGCACTGTCAGAGCAGTTCT  
CTGCAAATATAAAGAATTATCACGAACAACCTGCATACTTGGTACAATTCGAATCTTT  
TAGCATCTTTGGCTGATTGCTTTACGGTACAGTGCATATGTGAGTCGACTCGAGCA  
TTAGCTTACGTCAATTTAAGGACGCCAGACTACATCTCTCGAAGTCAACGCGTGTTT  
ACCTCGTAACTAGTCAACAGCCACCAAGTCACCAAAGCGCGTCAAATGGCTCGA  
AAATGATGGAGTAAGAAGCCAATCTGAGTGTGACACTTGAGCGTGCCTCCACATTC  
ATCTCATGCCTAAGTCCACAAGTTGTTTGTGCTGTTAGGTCCTTTGAAGCGCGTCTG  
ATGAACTTGAGGCCAAGATGCGTCTTGGATGAGGGATCCTGACAAGCCAGTAGTT  
CTTTCATTCTAGTTAGTCTAGGGAGTGAATATCCGCAGCACACCGCAAGGTCTC  
AAGCCAGACAATATCAAAGCTTGCTGGCCTACAGCCATTGAGTCTCAAACAGA  
GAAGTTGAATACCAAGCCGGCAACACCACACTACCAGACCGTGGGAGCGCTCTAT  
AGTCTCAACCACAACACCTTACAGTCCGTCAATTGAAGGAAGCTCTCCAGTGGCAA  
GGCTGTCGGAGTGAAGCTCGCGGAGTACTGCAATCATATAGTTTAAAGATTGCTCTG  
AATACCTTTTACAATTTTGAAGTGTGTTGAGTTATTTAATGACGTCGTCCTTCTA  
GCCAAGAGAATGCCAAACCATGGGCTTTTATTGAAAGAGATAAACAGATAATGTCCA  
AGGTGCTGGAGACTCAAATGAAAGCCCCTCTATACGAACGGTCGGGATTTGATTCA  
GTTTCAGAAATGAGCAATGAATGTAGTTGAGGTGTTACTGGGGATGCAACTCTGAGC  
GCGCCGAACGCGCTTCGCCAACATATTTGCATGCCATTCCAAAAGCCATAATATGA  
TTAGCTGCTTTATGTAAGAAATAGCTATTTTGCATCATTATATGCGTTGTTGTGTGTTGT  
GAATAGCTTCAATCCCGTGCCTCGTTAACTTTTGTGGCGTCGGCCACTGATAACC  
TCCTTAGTCAGCGTAGTAGCACCTTGTGTTGATCACATGATATACACCTCTCAGAATAT  
GAGCTG

**SECUENCIA GENOMICA ANAZ121 (cepa control)**

**5'UTR-azgA::azgA::linker::GFP::terminador::riboBAf::3'UTR-azgA**

AGGTTGCGGAGGGATCATGCTTGACCCCGCAGTCTGGGGTATGCGTAGTACGAC  
AGTCACGAGCGGAGGACTGCATGCGCCTCGATCGTTGTAGACCATTCTGATTGATT  
GAATCTGCAGGTGAGTTTGGCGTAGCAATGGATCTAGCTTGGCTTGTAAAGATACA

ATAATAGAAGTCGATAAGCCTGCGAACGGCTTCGGCCTTCGCCGCCAGCCCCATA  
GTGATCGGAGGTTGCAGAAGGCGTGCTTGGTTTTGTGCTATGATAGTAGGTTGTC  
AGGTGTTTATGAACTGCTAGGCCTAGGCGGATATCACTCTTAGCGCGGCGACAGG  
GCGTCTAGCGGGCCCAAGGACCCAGCGCAGAGGGCGGTTTCGCGTCAATGTCGG  
CAGATGGCGGATGCTGGGAGAAACGAGCATACTCAGAGTACATTTTGTGGATCGT  
ATACCCAGGTGGAGATGGCAGCTCATGGAGCTGCCATCTCCAATGACGAAATCATG  
AAGGCACAGCTAGGTGAAGCTGACAGTAATTTGCCTCCCGTAAGACGAATTAGTCG  
ATGATAAGCAACGGCCTGATACGTTACCCGGGGAGATCCGCCAGCGTACGCACTT  
TGGAGATGAACGCTGGCAGATGACTCGCGGGCTCAGGGACTCGTCCCGTGGATA  
ACTCGGCCAGTGAGGCCCTTCGAGCCTATCGCAGACGGTCCCCTCGATCCTGAA  
TACTGGTCTCGGCAATCTGGGCACATGGCAGAGATAAGGAATTTTTTTTTGCCCC  
AGTGGACGGTCGGGAAATAAAATCTCTAGCGCGCTGTCGTGTGAGCTTCTGGAAT  
GTCGTTTCTGCAGGCTGAGTCTCATCTTGACGCCCATTTCTATCCCAACGGCT  
TAGCCGGTTCGCTTTGCACCTCCTATTTGACCTCACAGACAGCATGGGGTACGCT  
GAGTGGATTGGCCGTACCAATGCGGCCGTGGCTCGTAGCCCGGTTCGGTTCGCTGG  
TTTCGCTTGGAGGGGTCCGGTCATGTATGTCTTTGAGCGCTCGTAGAGCGTTGTC  
CTTCTCTGGACTGCTCGCTGTATGCGAGCCTGGGAATAAATCCTTCTCACTAATTC  
GCGCTGTCTTCAGCCCCGCGAGCGAAAAGGCGCGTACTTCTTACC GAATTGCG  
TGCCGGCCTTGCCACCTTCTTCGCTATGGCCTACATTATTTCCGTGAACGCCAATAT  
CACGAGGTACGTACCGTTATGAGGAGCGACATGCCCAACGAGAAAATCGACTG  
GAGGTGCTGACGAGAACGTCTGTTCACTGATACAGGAGGAACATGTGTCTGTCCA  
GCCGAAGACCTCGCAACGGCGTGCGACAACAACACCGAGTACCTCCTATGCAAG  
CAGGAGGTTAACCGTGATCTGGTGA CTGCAACGGCGGCGATCGCCGCCATTGCG  
AGCTTCTTCTCGGTCTTCTCGGAATCTGCCCGTTCGCTCTGGCCCCGGGAATGG  
GTCTCAACGCGTACTTTGCCTATACTGTCGTTGGTTCATCATGGTACCGGATTGATCC  
CCTACAGTCTTGCAGTGA CTGCGGTTTTTCGTCGAGGGCTGGATTTTCTCGGTTT  
GACTTTACTCGGTATCCGGCAGTGGCTTGCTCGTGCCATTCCCGCCTCGATTAAC  
TCGCGACCGGCGCCGGTATTGGATTGTACCTGACGCTGATCGGTCTCAGCTATAGT  
GCCGGTCTTGGAGTTGTGCAGGGGGGTACAAGCAGCCCTATTAGTTAGCCGGCT  
GCGCGTCAGATACGTTTCGGCGACGACGGGTTGTGTCTTCGTCCGAAAAAATGCG  
CAATCCCACAATGTGGATTGGTATCTTTTTCGGCGGTGTTTTCACTGTCTTCTTGAT  
GATGTATAGGGTCAAGGGTGCAGTGATTGCTGGTATCCTGCTTGTCTCGATCATCT  
CATGGCCGCGTCCGACCCAGTTACCTATTTCCCCACACAGAAACCGGTGACAG  
CTCGTTTGATTTCTTCAAGAAAGTCGTCACCTTCCATCCGATTCAGCATACTCTGGT  
GGCGCAGGAATGGAATATCTCCAGTAATGGTGGACAGTTTGGCCTCGCATTGATCA  
CGTTCTTGATGCTATCTAGCTCGTTCGGTATATACAGAGCCCTGCTAACTGGGAT  
AGTACGTCGACATTCTCGACGCTACGGGTACATTATACTCAATGGCCAAGTTTGCT  
GGCGCCATGGACGAGCGCACCCAGGATTTGAAGGCAGTGCTATGGCTTATGTAG  
GCCTCTCACACCCTCTCGTGAAAACATCGCTAACTATAGTAGATGGTTCGACGCAA  
TCTGCATTTCCATCGGTTCTTTGTTTCGGTTCTCCGCCTGTTACAGCATTTCGTCGAG  
AGCGGTGCTGGTATTTTCGGAAGGTGGAAAGACCGGTCTGACATCATGTATGACCG  
GTATCTGCTTCTTCATCGCCGTCTTCTTTGCGCCTATCTTCGCCTCGATTCTCCAT  
GGGCCACTGGCAGTACATTGGTCAATGTCGGCTCCATGATGATGCATGCGACACTC  
GAGATCAACTGGCGGTATCTTGGAGACGCGGTTCCCGCGTTCTTGACGATTTGCG  
TCATGCCATTACCTACAGCATTGCCGACGGCCTGATCGCCGGTATCTTGAGCTAC  
ATCCTCATCAACGGAGGTGTGTGGATTGTTGCCAAGTTGACTGGAGGCCGGATTT  
CTCCTCCTAACC GCGAGGAGGAGCACGAGCCGTGGACCTGGAAAATCCCAGGAG  
GATTTTTCCCGCCATGGCTGGTGC GTGCGGTTTCATGGGAAGAAGGACTTCTGGCG  
GGCTGAAGATGATGCCAATGATCTTAGCCTTGGCGTCATGCCTCACGGGTGCTC  
TCGTGCGAGGATCGCGCGGGCGAGAACTTGATCCTCAAAGGAACAGGTCACG  
GAGAAAAGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCAGTAAAGGAGAAGAACTT

TTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAA  
TTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAA  
ATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACTGTTCCATGGCCAAACACTTGTCACTACTTT  
CACCTATGGTGTCAATGCTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTT  
CTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAAA  
GACGACGGGAACATAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTC  
GTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCG  
GCCACAAGTTGGAATACAACATAACTCCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAG  
CAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCG  
GCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTC  
CTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTCGAAAGATCCCAAC  
GAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACA  
TGGCATGGATGAACTATACAAA**TAAACCGGTC**GCCTCAAACAATGCTCTTACCCT  
CTTCGCGGGTCTGAAATACCCTCACCTGGCAACAGCAATTGGCGCTTCATGGCTG  
TTTTTCCGATCTCTCTACTTGTACGGCTATGTGTACTCGGGTAAGCCACAAGGCAA  
GGGCAGATTGCTGGGAGGTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTG  
AGTGTGTTTGGTGTGGCCAAAGACATGATCTCTTACTGAAAGAGGCCGTTTCAGGAG  
TCTGGCTCGTTTGATCACATGGGATTAATAATGGTGTGAGGCTGGGATATTTTAT  
GTTTTGTCTCTTGCCTTCGATATCAACAGATTGACAATAATGAATAACTATCTACGG  
ACTATGAATGCAGCTCGATCTACTCCGTATTTAGTCGGGCAATCTCCCGTAGAAGAT  
GCTAGACTGCGCTGAAAGACTAGGCACAGTTAATTGCCGCGGATCACGTCAGGCC  
TGACAAATGACAGGTGGACCTTCATGTAATCGCACGATGAGTCAGCGCCTCTTCTC  
CCCCGCCGACTTGCAGCTGCGGATGTCCCAGGAGCCGAACATTGAATCTATCCC  
AAGAGTGACTGAAATATGATTGCAATCGTCGTCTTTTTCTTGCAGAGAATGTGGTGA  
GGTGATCAATCGTGTTTTTCTTCATATATTATTTCTGTAATGATCATACTTTGTTGAG  
ATACCGTCTCTAAAATTGTACTTTCGCCTCCCTCCTCCCTCTCAAGTCCGTCATCG  
CAATGTCGAATTTACCGTCCCATGCTTCTCCGTCTTTGGGGCGCAAACGCCTACC  
ACGCCGAGCCCGTGCAGGAGCTTCTCTCAAGTCGAACATCACATCAGCCCCTG  
CGTTACTCTCAGATTAGACGAACTCCGAGATGAGACTTCCAGCCAGATCAGCAG  
CATAGACACTGACCGCGGGGACATGACCCCTGCGGTTCCCGCATCATTACTCTCC  
CCATCCTTCACTCCTCCAGCAACCCCCGGGGGCTCGATCAATACCGCGGAGCTGC  
TTCAACAGACCCAATTAGCTGGCGCACGGCAAGGGTCAACACATACTAAGCCCCC  
GAGGTTGCTTTCTCGTCTTCCCAATGTCGAATGTATCGTCCGCGCTCGGATACCCA  
CGACAACACTGGCGCGGAGATGTTTCTTACCTGTACCACAATGACTTAGACAACAAA  
GAGCATTGGCGATTGTGTTTGGAAATACAATTCGAAGCAGAAGCTTGACAAGAT  
CCGGCCTGGAGAGACGGAGATGGATCGCATGATCCGTGGCGGTATGTGGGAA  
ACTCCGACCGGGCCGTGTGAGCAGCTGGTATGACGAGGAGAAAGCTGAAGAGGC  
CGCCAGTCCGGAAGCTGGCGGCGCTGTATCCAGTCCGCACACACTGCCGCGAAG  
TAGCCTCAAGGAGGCACCTCTTGTGAGAATCCATTCCGAGTGCTACACTGGTGAG  
ACGGCTTGGTCTGCACGCTGCGACTGCGGCGAGCAGCTCGATGAAGCAGCTCGC  
CTCATGTCGCTGCCTATGGAAACGTTGGCAGAGGCTGCGTCACCGCCGGATGGG  
GCGGTACCGTCAAATGCTGCTGGAGGTGTAATTGTGTACCTGCGCCAAGAAGGAC  
GAGGCATTGGGCTGGGCGAGAACTGAAAGCGTACAATCTTCCAGGATCTGGGATC  
AGACACGGTGAAGCCAATCTCCTGCTTCGCCACCCTGCGGATGCAAGAAGTTAT  
GGATTAGCTACGGCGATCCTGGTGGATCTTGGTCTAGGGATTGACTCGAATCCGCA  
CGGCATCCGACTACTCACGAATAACCCGGACAAGATTCCGAGCGGTTGAGGGACCC  
AACCGAGAAGTGGTGGTGAAGAGCGGGTGCCGATGGTGCCATTGGCATGGAGA  
TCGGGTGAAAGATGGGAATCAAGAGTTCCGAGGTCGAAGGGTATCTGAGAACGA  
AGGTATGTCGACAATCTATCTTCTGCAAGCTAGCTTATTTCTCATCATTCTTAAACA  
ATGTCTCACTCTCCTCGCAGATATCGAAAATGGGCCATTTGCTCCAAT**GAA**ACCTA  
TCCCTTTCCGGTTAGTAACCTTGTGCTGGAAGTACGCCTTCTGCTTTTGGACTTA

GCCAAGTCGACACGGTGTATGCTCGTCACACTCATGTAACGGTTCTGCAGCCCAA  
CGTGACCGGTATAGTATAGACAGATGGAGGAACCTAATTTATTCAGAGAGCGAACG  
AAAGACGTTCTCCAATATGTATAATTGTTATAGCGCATGCACTGTCAGAGCAGTTCT  
CTGCAAATATAAAGAATTATCACGAACAACCTGCATACTTGGTACAATTCGAATCTTT  
TAGCATCTTTGGCTGATTGCTTTACGGTCACGTGCATATGTGAGTCGACTCGAGCA  
TTAGCTTACGTCATTTAAGGACGCCAGACTACATCTCTCGAAGTCAACGCGTGTTT  
ACCTCGTAACTAGTCAACAGCCACCAAGTCACCAAAGCGCGTCAAATGGCTCGA  
AAATGATGGAGTAAGAAGCCAATCTGAGTGTGACACTTGAGCGTGCCTCCACATTC  
ATCTCATGCCTTAAGTCCACAAGTTGTTTGTCTGTTAGGTCCTTTGAAGCGCGTCTG  
ATGAACTTGAGGCCAAGATGCGTCTTGGATGAGGGATCCTGACAAGCCAGTAGTT  
CTTTCACCTTAGTTAGTCTAGGGAGTGAATATTCCGCAGCACACCGCAAGGTCTC  
AAGCCAGACAATATTCAAAGCTTGCTGGCCTACAGCCATTCAGTCCTCAAACAGA  
GAAGTTGAATACCAAGCCGGCAACACCACACTACCAGACCGTGGGAGCGCTCTAT  
AGTCTCAACCACAACACCTTACAGTCCGTCATTGAAGGAAGCTCTCCAGTGGCAA  
GGCTGTCGGAGTGAAGCTCGCGGAGTACTGCAATCATATAGTTTAAAGATTGCTCTG  
AATACCTTTTACAATTTTGAAGTGTGTTTGAAGTATTATTTAATGACGTCGTCCTTCTA  
GCCAAGAGAATGCCAAACCATGGGCTTTTATTGAAAGAGATAAACAGATAATGTCCA  
AGGTGCTGGAGACTCAAATGAAAGCCCCTCTATACGAACGGTCGGGATTTGATTCA  
GTTTCAGAAATGAGCAATGAATGTAGTTGAGGTGTTACTGGGGATGCAACTCTGAGC  
GCGCCGAACGCGCTTCGCCAACATATTTGCATGCCATTCCAAAAGCCATAATATGA  
TTAGCTGCTTTATGTAAGAAATAGCTATTTTGCATCATTATATGCGTTGTTGTGTGTTGT  
GAATAGCTTCAATCCCGTGCCTCGTTAACTTTTGTGGCGTCGGCCACTGATAACC  
TCCTTAGTCAGCGTAGTAGCACCTTGTGTTGATCACATGATATACACCTCTCAGAATAT  
GAGCTG

Secuencia aminoacídica **azgA**-**Ct.ureA**-**linker**-**GFP**:

MGYAEWIGRTNAAVARSPVGRWFRLEGSGLHRAVLQPRERKGGAYFFTELRA  
GLATFFAMAYIISVNANITSDTGGTCVCPAEDLATACDNNTTEYLLCKQEVNRDLV  
TATAAIAAIASFFLGLLANLPVALAPGMGLNAYFAYTVVGHHTGLIPYSLAVTAV  
FVEGWIFLGLTLLGIRQWLARAIPASIKLATGAGIGLYLTLIGLSYSAGLGVVQGG  
TSSPIQLAGCASDTFGDDGLCPSSEKMRNPTMWIGIFCGGVFTVFLMMYRVK  
GAVIAGILLVSIISWPRPTPVTYFPHTETGDSSFDFFKKVVFHPIQHTLVAQEW  
NISSNGGQFGLALITFLYVDILDATGTLYSMAKFAAMGAMERTQDFEGSAMAYMV  
DAICISIGSLFGSPPVTAFFVESGAGISEGGKTGLTSCMTGICFFIAVFFAPIFASIP  
PWATGSTLVIVGSMHMMHATLEINWRYLGDVPAFLTISLMPFTYSIADGLIAGILS  
YILINGGVWIVAKLTGGRISPPNREEEHEPWTWKIPGGFFPPWLVRAVHGKGD  
FWRAEDDANDLSLGVMPHGLSSQDRAGEKLASSKEQVTEKPLWEGRSSIK  
RVGKLMLLDAMGRQWKSSALVGQG**DEESE**SGSGAVTPSE**KIVAK**GAGAGA  
GAGASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTT  
GKLPVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD  
DGNKYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNVSHNVYIMADK  
QKNGIKANFKTRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVYSTQSALSK  
DPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK