

PEDECIBA BIOLOGÍA  
SUBÁREA MICROBIOLOGÍA

Caracterización de transportadores  
de Basidiomycotas mediante  
expresión heteróloga en  
*Aspergillus nidulans*

Manuscrito para la obtención del título de Magister en Ciencias  
Biológicas

Lic. Mariana Barraco Vega

Montevideo, Uruguay  
Diciembre 2014

Dirección de tesis:

Dra. Gianna Cecchetto

Laboratorio de Microbiología  
Instituto de Química Biológica  
Facultad de Ciencias-Facultad de Química  
Universidad de la República

# Agradecimientos

---

A mi princesa, por ser mi compañera incondicional durante toda la escritura, por darme el mejor de los títulos y hacerme sentir cada día más plena.

A Juanchi, por acompañarme en cada paso, por darme las dosis de fuerza, amor y rezongo que necesito cuando la necesito.

A Gianna, por ser mucho más que mi tutora, por enseñarme mucho más que ciencia, por acompañarme siempre.

A mis padres, por apoyarme en esta etapa como siempre y al abuelo “mu” por darme esos ratos tan valiosos durante el último tramo.

A todos los integrantes de la Cátedra de Microbiología, por hacer que la “suma microbiológica”  $12+14+13+17+18+11+15 = \text{GRAN}$  lugar de trabajo.

A Mari y Lía, por tantas charlas, consejos, manos, por estar siempre para ayudarme.

A Matilde, por haberme abierto la puerta a la docencia que tan feliz me hace.

A las rubias, por hacer que luego de cada charla de “crisis vocacional” me sienta orgullosa de ser Bioquímica.

A Manuel Sanguinetti, por los protocolos, reactivos, por la respuesta a tantos mails.

Al tribunal por tener la mejor disposición a pesar de que las fechas hayan quedado muy por fuera de lo previsto.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por financiar el proyecto y la beca que me permitieron realizar esta tesis.

# Resumen

---

Los hongos utilizan una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno. El amonio y la glutamina son los compuestos preferidos pero cuando no están disponibles, son capaces de crecer con fuentes alternativas para lo cual cuentan con vías catabólicas y transportadores específicos y regulados. En particular, las purinas son utilizadas como fuente de nitrógeno por diferentes especies. La identificación de varios transportadores ha permitido caracterizar tres familias, NCS1 y NAT, conservados desde bacterias a plantas y mamíferos respectivamente; y, *AzgA-like*, que incluye homólogos en procariontes, hongos y plantas. Entre los hongos secuenciados, todos los filamentosos y *Schizosaccharomyces sp* poseen secuencias tipo *AzgA* pero hasta la fecha los únicos integrantes con función verificada son: *AzgA* de *Aspergillus nidulans* y *AfAzgA* de *Aspergillus fumigatus*

En el marco de estudios de basidiomycotas degradadores de madera y bajo la premisa de que el hábitat de estos organismos es limitante en nitrógeno, nuestro grupo se propuso analizar la presencia de transportadores de purinas en dos especies: *Phanerochaete chrysosporium* (organismo modelo cuyo genoma ha sido secuenciado) y *Punctularia atropurpurascens* (aislado de nuestra región). Ambos crecen en presencia de purinas como única fuente de nitrógeno.

En el presente trabajo demostramos que *P. chrysosporium* tiene dos transportadores específicos de purinas funcionales: PhU, del tipo NAT; y PhZ que pertenece a la familia *AzgA-like*. El gen *phU* se induce en presencia de purinas y en condición de carencia de nitrógeno y se reprime en presencia de amonio, urea o aminoácidos. El gen *phZ* se induce en presencia de adenina o hipoxantina, y se reprime en presencia de urea o aminoácidos. Con el objetivo de estudiar su funcionalidad, los genes fueron expresados en *A. nidulans* (cepa deficiente en los transportadores principales), cuyo catabolismo y sistema de captación de purinas están ampliamente estudiados. Así, *phU* y *phZ* fueron introducidos mediante recombinación homóloga en el mismo contexto genético. Los transformantes obtenidos permitieron identificar los sustratos transportados por cada proteína, PhZ transporta las purinas más reducidas y sus análogos mientras que PhU transporta todas las purinas y análogos. La fusión a GFP permitió establecer que ambos transportadores se localizan en la membrana en presencia de sustrato y responden a los mecanismos de regulación postraduccional del organismo hospedero: endocitosis del transportador en respuesta a amonio y presencia de sustratos.

*P. atropurpurascens* (cuyo genoma no ha sido secuenciado) tiene por lo menos un gen (*puZ*) con alta homología con transportadores *AzgA-like*, que fue clonado obteniéndose una secuencia parcial a partir de la cual se deduce una proteína de 494 residuos. Los mayores niveles de expresión del gen *puZ* a nivel transcripcional, se observan en ausencia de nitrógeno.

Por último, con las proteínas *AzgA-like* de función conocida (incluida PhZ) y proteínas hipotéticas homólogas (incluida PuZ parcial) identificamos 34 residuos invariantes y cuatro motivos conservados que caracterizan esta familia de transportadores. Seis residuos en dos de estos motivos se mutagenizaron *in vitro* para su posterior análisis con el objetivo de establecer los determinantes estructurales de la función de los transportadores de esta familia.

# Abreviaturas

---

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico copia producto de la transcripción reversa de ARNm
ADNg	Ácido desoxiribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Trifosfato de adenosina
BrEt	Bromuro de Etidio
CMAC	7-amino-4-clorometil coumarin
Ct	Ciclo umbral
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa	Desoxiribonucleasa
dNTPs	2-Deoxinucleótidos 5´trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-ácetico
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Trifosfato de guanosina
paba	p-Amino Benzoico
Kb	Kilobases
MVB	Cuerpos multivesiculares
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pyro	Piridoxina HCl
qRT-PCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
ribo	Riboflavina
RNAsa	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
STM	Segmentotransmembrana
TBE	Buffer Tris Borato
TE	Buffer Tris EDTA

# 1 Contenido

---

1	Contenido.....	1
1.1	Lista de figuras .....	3
1.2	Lista de Tablas.....	4
2	Introducción .....	5
2.1	El metabolismo del nitrógeno en hongos: Fuentes secundarias.....	5
2.2	El metabolismo de las purinas .....	6
2.3	La vía de degradación de purinas en <i>Aspergillus nidulans</i> .....	8
2.4	Transportadores de bases nucleótídicas en hongos .....	10
2.4.1	Familia NAT .....	12
2.4.2	Familia NCS1-PRT .....	13
2.4.3	Familia <i>AzgA-like</i> .....	13
2.5	Regulación transcripcional de los transportadores de purinas .....	14
2.5.1	Regulación de los transportadores de purinas de <i>A. nidulans</i> en respuesta a la fuente de nitrógeno y disponibilidad de purinas.....	14
2.5.2	Regulación de los transportadores de purinas de <i>A. nidulans</i> durante la germinación de conidiosporas. ....	16
2.6	Regulación post-traducciona l de los transportadores de purinas .....	17
2.6.1	Regulación a nivel del tráfico y endocitosis. ....	17
2.7	Relaciones estructura-función de los transportadores de purinas de <i>Aspergillus nidulans</i> 22	
2.8	<i>Aspergillus nidulans</i> y las herramientas moleculares para el estudio de transportadores de purinas.....	28
2.8.1	Mutaciones.....	28
2.8.2	Test de crecimiento .....	29
2.8.3	Ensayos de cinética de transporte .....	29
2.8.4	Visualización mediante microscopía de fluorescencia .....	30
2.8.5	Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i> .....	31
2.9	Transportadores de purinas en basidiomycotas degradadores de madera. ....	33

3	Objetivos .....	36
3.1	Objetivo general.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	Resultados .....	37
4.1	Caracterización de los transportadores de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	37
4.1.1	Clonado de secuencias codificantes de los transportadores PhZ y PhU .....	37
4.1.2	Análisis de la estructura secundaria de las proteínas transportadoras PhU y PhZ .	40
4.1.3	Estudios de expresión génica de <i>phZ</i> y <i>phU</i> .....	44
4.1.4	Construcción de <i>A.nidulans::phZ</i> y <i>::phU</i> .....	46
4.1.5	Análisis del transporte de purinas, derivados y análogos .....	53
4.1.6	Localización subcelular de los transportadores PhZ y PhU .....	60
4.2	Estudio del transportador de purinas de <i>Punctularia atropurpurascens</i> .....	62
4.2.1	Análisis de PuZ .....	62
4.2.2	Estudios de expresión génica de <i>puZ</i> .....	64
4.3	Avances en la caracterización de la familia <i>AzgA-like</i> .....	68
5	Discusión y Perspectivas.....	73
6	Conclusiones .....	81
7	Materiales y Métodos.....	82
7.1	Materiales .....	82
7.1.1	Cepas .....	82
7.1.2	Medios de cultivo .....	85
7.1.3	Plásmidos .....	89
7.1.4	<i>Primers</i> .....	90
7.2	Métodos.....	93
7.2.1	Técnicas empleadas con <i>A. nidulans</i> .....	93
7.2.2	Técnicas empleadas con <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. atropurpurascens</i> .....	96
7.2.3	Técnicas empleadas con ácidos nucleicos .....	97
7.2.4	Análisis Bioinformáticos .....	105
8	Bibliografía .....	108

## 1.1 Lista de figuras

Figura 2-1: Estructura química de purinas.....	6
Figura 2-2. Metabolismo de las purinas. ....	7
Figura 2-3: Vía de degradación de las purinas en <i>A. nidulans</i> .....	9
Figura 2-4: Diferencias entre transportadores y canales.....	11
Figura 2-5: Pasos del proceso de germinación de <i>A. nidulans</i> .....	17
Figura 2-6: Tráfico de proteínas dependiente de Rsp5.....	19
Figura 2-7: Microscopía de Epifluorescencia de UapA-GFP y AzgA-GFP.....	22
Figura 2-8: Estructura teórica de UapA.....	25
Figura 2-9: Interacciones UapA-sustrato.....	26
Figura 2-10: Estructura teórica de AzgA.....	27
Figura 2-12: Test de crecimiento como herramienta para el estudio de transportadores de purinas.....	29
Figura 2-13: Microscopía de epifluorescencia como herramienta para el estudio de transportadores.....	31
Figura 2-14: Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i> . ....	33
Figura 2-15: Crecimiento en purinas de <i>P. chrysosporium</i> (A) y <i>P. atropurpurascens</i> (B).....	35
Figura 4-1: Gen <i>phZ</i> y proteína PhZ de <i>P. chrysosporium</i> . ....	38
Figura 4-2: Gen <i>phU</i> y proteína PhU de <i>P. chrysosporium</i> . ....	39
Figura 4-3: Análisis de PhU, y homólogos NAT de función conocida. ....	41
Figura 4-4: Análisis de PhZ, y homólogos <i>AzgA-like</i> función conocida. ....	43
Figura 4-5: Determinación de condición no inductora-no represora para <i>phZ</i> y <i>phU</i> : ....	45
Figura 4-6: Evaluación de nitrato como condición no inductora-no represora de <i>phZ</i> y <i>phU</i> . ....	45
Figura 4-7: Acumulación de ARNm de <i>phZ</i> y <i>phU</i> . ....	46
Figura 4-8: Esquema de la construcción del <i>cassette 5'azgA-transportador-gfp-ribo-3'azgA</i> mediante la técnica de fusión por PCR.....	48
Figura 4-9: Construcción de <i>cassettes 5'azgA-transportador-gfp-ribo-3'azgA</i> .....	48
Figura 4-10: Verificación de delección <i>uapC</i> de cepa receptora.....	50
Figura 4-11: Test de crecimiento de cepa receptora:.....	51
Figura 4-12: Verificación de delección <i>nku</i> de cepa receptora.....	51
Figura 4-13: Análisis de crecimiento de transformantes .....	53
Figura 4-14: Verificación de <i>cassette</i> en transformantes seleccionados .....	53
Figura 4-15: Transporte de purinas (Fuente de nitrógeno). ....	54
Figura 4-16. Crecimiento en análogos y derivados de purinas. ....	55
Figura 4-17: Análogos de purinas tóxicos.. ....	56

Figura 4-18: Análogos y derivados de purinas que transporta PhZ.....	57
Figura 4-19: Transporte de purinas a través de PhZ (competencia) .....	57
Figura 4-20: Análogos y derivados de purinas no transportados por PhZ. ....	58
Figura 4-21: Análogos y derivados de purinas que transporta PhU. ....	59
Figura 4-22: Transporte de purinas a través de PhU (competencia).....	59
Figura 4-23: Análogos y derivados de purinas no transportados por PhU. ....	60
Figura 4-24: Localización subcelular de PhZ y PhU.....	61
Figura 4-25 : Secuencia parcial de PuZ. ....	63
Figura 4-26: Alineamiento PuZ y homólogos <i>AzgA-like</i> . ....	64
Figura 4-27: Determinación de eficiencia de amplificación de <i>pugpd</i> y <i>puZ</i> . ....	65
Figura 4-28 : Cinética de expresión de <i>puZ</i> . ....	66
Figura 4-29: Acumulación de ARNm de <i>puZ</i> . ....	67
Figura 4-30: Determinación de fuente de nitrógeno no inductora-no represora de <i>puZ</i> .....	67
Figura 4-31: Motivos <i>AzgA-like</i> . ....	71
Figura 4-32: Identificación de clones <i>phZ</i> -mutantes. ....	72
Figura 5-1: Interacciones <i>AzgA</i> -sustratos.....	79
Figura 7-1: Esquema de la amplificación de <i>puZ</i> mediante RACE PCR.....	101

## 1.2 Lista de Tablas

Tabla 2-1: Clasificación, especificidad y cinética de transportadores de bases nucleotídicas de hongos.....	12
Tabla 2-2: Resumen de los residuos críticos para la función de UapA. ....	25
Tabla 4-1: Motivos <i>AzgA-like</i> . ....	70
Tabla 7-1: Cepas de <i>A. nidulans</i> utilizadas en esta tesis.....	82
Tabla 7-2: Plásmidos utilizados .....	89
Tabla 7-3: <i>Primers</i> utilizados.....	90



## 2 Introducción

---

### 2.1 El metabolismo del nitrógeno en hongos: Fuentes secundarias

Todo organismo requiere nitrógeno para vivir. Debido a que es uno de los componentes principales de la mayoría de las macromoléculas con importancia estructural y funcional, tanto procariotas como eucariotas han desarrollado los mecanismos necesarios para asegurar una constante fuente del mismo. Extensos estudios sobre el metabolismo del nitrógeno y su regulación se han llevado a cabo en organismos modelos como *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*. Los hongos pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno siendo capaces de expresar las enzimas necesarias para poder llevar a cabo variadas vías catabólicas. El amonio y la glutamina son los compuestos preferidos por los hongos pero cuando estas fuentes de nitrógeno primarias no están disponibles o están presentes en una concentración tan baja que limita el crecimiento, compuestos como nitrato, nitrito, purinas, amidas, aminoácidos y proteínas pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno alternativa. La utilización de estas fuentes secundarias está altamente regulada y casi todas requieren la síntesis de las enzimas catabólicas específicas y de las permeasas en cuestión. Su utilización normalmente implica la inducción de genes, que no se activan en presencia de fuentes preferenciales (represión catabólica por nitrógeno). La síntesis *de novo* de permeasas y enzimas catabólicas de una vía particular está controlada transcripcionalmente y usualmente requiere de dos señales positivas distintas: una señal indicadora global de desrepresión del catabolismo del nitrógeno (también llamada represión por amonio) y una inducción o activación de aquellos genes que intervienen en una ruta particular debida a la presencia de un sustrato o intermediario específico de la misma. Estos dos requerimientos permiten la expresión selectiva de la enzima que interviene en una ruta catabólica cuando su sustrato está presente y no hay una fuente primaria disponible. Sin embargo otros sistemas, están controlados únicamente por una señal de desrepresión global sin tener en cuenta ningún tipo de inducción.

Proteínas reguladoras globales como AreA en *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990; Caddick, 1992), Nit-2 en *N. crassa* (Stewart & Vollmer, 1986; Fu & Marzluf, 1987), Gln-3 en *S. cerevisiae* (Minehart & Magasanik, 1991) y NrE en *Penicillium chrysogenum* (Haas *et al.*, 1995), regulan positivamente la expresión de los genes estructurales que intervienen en la asimilación de fuentes secundarias de nitrógeno.

Además de la señal indicadora global de desrepresión del catabolismo del nitrógeno, la expresión de genes estructurales depende de proteínas reguladoras específicas. Cada una de estas proteínas parece actuar positivamente proporcionando el mecanismo que permite la activación selectiva, vía inducción de un conjunto específico de genes que codifican enzimas de una ruta particular entre

un amplio rango de enzimas que intervienen en el metabolismo del nitrógeno. Muchos factores específicos están implicados en este tipo de regulación, como por ejemplo, NirA, PrnA, UaY en *A. nidulans*, Put3 en *S. cerevisiae* y Nit4 en *N. crassa*. (Yuan *et al.*, 1991; Crawford & Arst, 1993; Marzluf, 1997; Siddiqui & Brandriss, 1998; Strauss *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2002).

Las señales globales de regulación cooperan con múltiples proteínas reguladoras específicas de ruta para poner en marcha genes catabólicos, dependiendo de la disponibilidad de sustratos y necesidades de nitrógeno.

## 2.2 El metabolismo de las purinas

Las purinas son compuestos orgánicos (heterocíclico aromático) cuya estructura está compuesta por dos anillos fusionados, uno de seis átomos otro de cinco, en total estos anillos presentan cuatro nitrógenos (Figura 2-1).

Estos compuestos nitrogenados son esenciales para la célula. Componen los ácidos nucleicos, son necesarios para la síntesis de algunos aminoácidos y coenzimas e intervienen en el mantenimiento del pool energético bajo la forma de ATP, GTP. Además muchos microorganismos pueden utilizarlas como fuente de nitrógeno (Vogels & Van der Drift, 1976).

Existen dos tipos de vías metabólicas que conducen a la formación de purinas, la vía síntesis de *novo* y la vía de recuperación; y una vía metabólica que conduce a la degradación de las mismas. Las tres vías han sido estudiadas en bacterias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), hongos (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *N. crassa*) y mamíferos (hombre y ratón), señalándose que las tres no existen en todos los organismos (Figura 2-2).

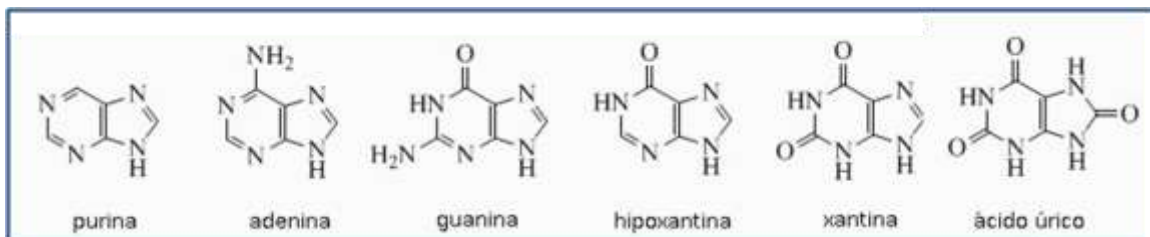


Figura 2-1: Estructura química de purinas. Extraído y modificado de Gómez-Esteban, 2009.

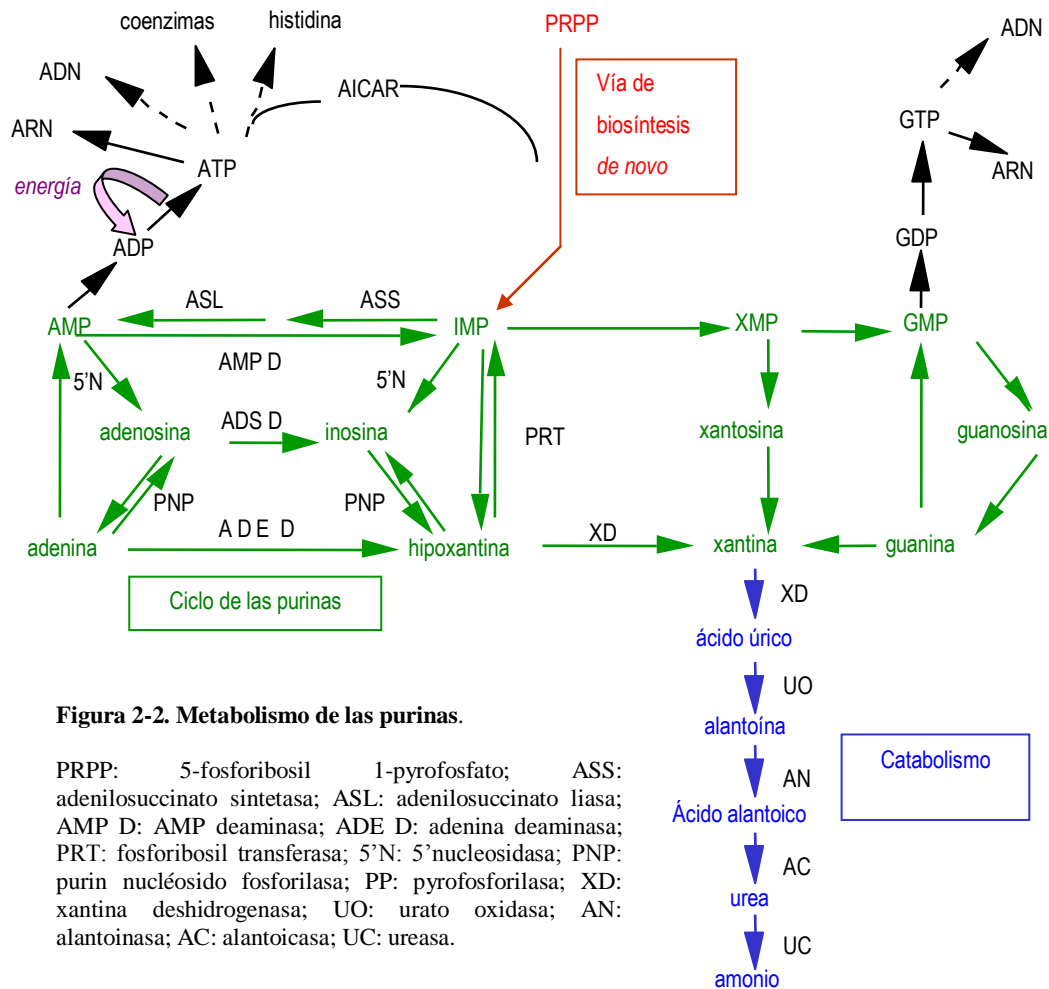


Figura 2-2. Metabolismo de las purinas.

El ciclo de las purinas (vía de recuperación) que implica la interconversión de las mismas permite equilibrar las cantidades de cada metabolito según las necesidades del organismo. También posibilita la degradación de las mismas ya sea para utilizarlo como mecanismo de detoxificación o de obtención de nitrógeno. La actividad de las enzimas de este ciclo se encuentra cuidadosamente regulada en base a las necesidades energéticas y de metabolitos de la célula (Manfredi & Holmes, 1984). La vía de síntesis de *de novo* se encuentra regulada por mecanismos de retroinhibición que cooperan en la velocidad global de la síntesis y en la velocidad relativa de formación de los productos finales. En *B. subtilis* ha sido descrito un mecanismo de retroregulación de la vía de síntesis de *de novo* ejercido por ciertos compuestos del ciclo como adenina y guanina (Saxild & Nygaard, 1991).

El compuesto final obtenido como resultado de la vía de degradación de las purinas varía según el organismo. Pero además de la naturaleza del compuesto, la función del mismo también es

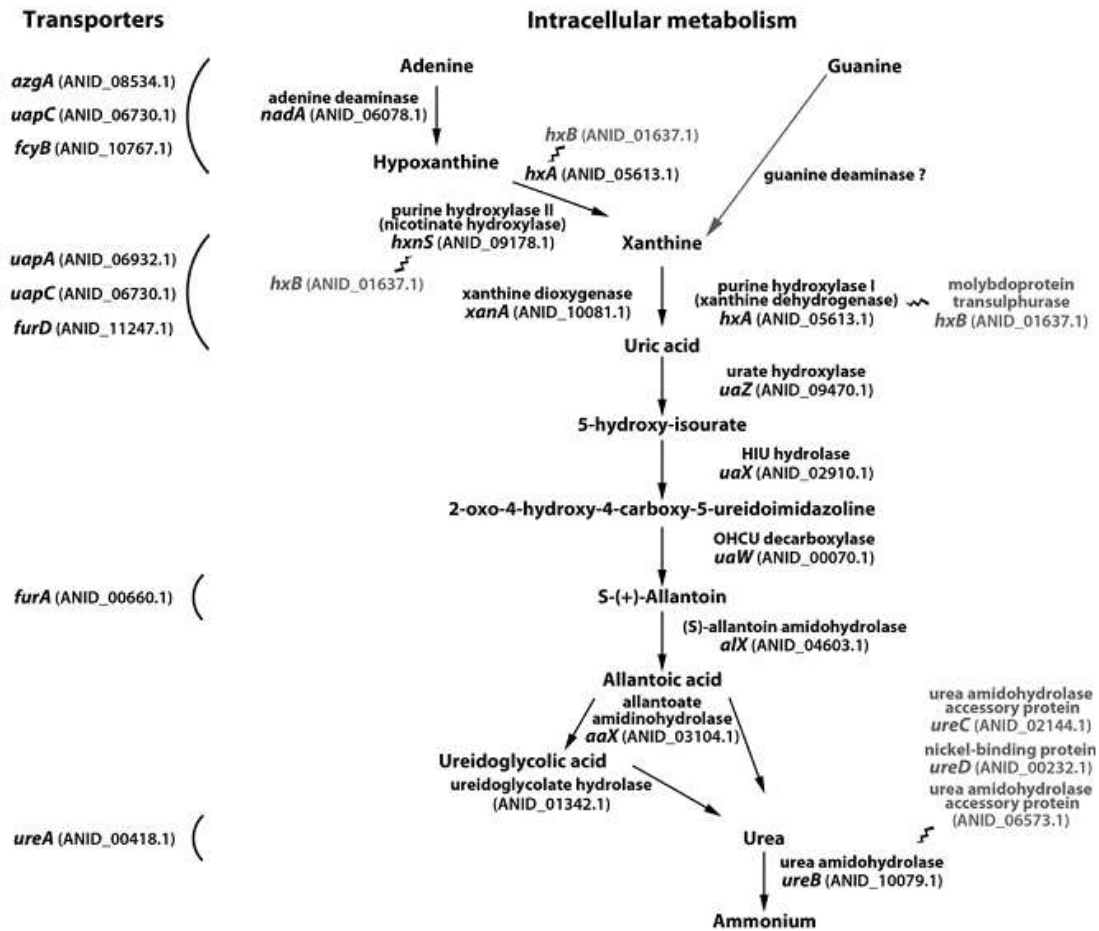
variable. Los animales producen distintos compuestos de degradación que siempre son tóxicos y se excretan. En primates aves y algunos otros animales se produce ácido úrico (Murray, 1971), en peces se produce urea o amonio, los moluscos producen guanina o xantina, los insectos alantoína o ácido alantoico (Vogels & Van der Drift, 1976). En plantas la alantoína o el ácido alantoico obtenidos como producto final de la vía no se excretan sino que se almacenan (Yabuki & Ashihara, 1991). En numerosos microorganismos el producto final es el amonio, el cual no es ni excretado ni almacenado ya que puede ser utilizado como fuente de nitrógeno. Menos frecuentemente la degradación de las purinas puede servir además como fuente de carbono como en *Penicillium roqueforti* (Vogels & Van der Drift, 1976).

La mayoría de los estudios sobre el metabolismo del nitrógeno y en particular de las purinas se han llevado a cabo en organismos modelo como *A. nidulans*, *S. cerevisiae* y *N. crassa* pero muy poco se conoce a nivel de otras especies con importancia comercial o sanitaria, como por ejemplo los patógenos de plantas y animales.

### **2.3 La vía de degradación de purinas en *Aspergillus nidulans***

La vía de degradación de purinas ha sido extensamente estudiada en una variedad de organismos. Con la excepción de algunas bacterias anaeróbicas, la vía siempre implica la apertura oxidativa del anillo purínico para dar lugar a urea (Vogels & Van der Drift, 1976).

El ascomycota *A. nidulans* puede usar las purinas naturales (adenina, guanina, hipoxantina, xantina, ácido úrico) y sus metabolitos (alantoína, ácido alantóico y urea) como fuente de nitrógeno pero no de carbono. La vía de degradación de las purinas de *A. nidulans* (Figura 2-3) es una de las vías metabólicas mejor caracterizadas desde el punto de vista genético, fisiológico y molecular. El aislamiento de mutantes de pérdida de función en cada una de las etapas de transformación de los sustratos permitió la identificación de las enzimas responsables y sus correspondientes genes (Darlington *et al.*, 1965; Scazzocchio & Darlington, 1968; Scazzocchio, 1994; Gournas *et al.*, 2011).



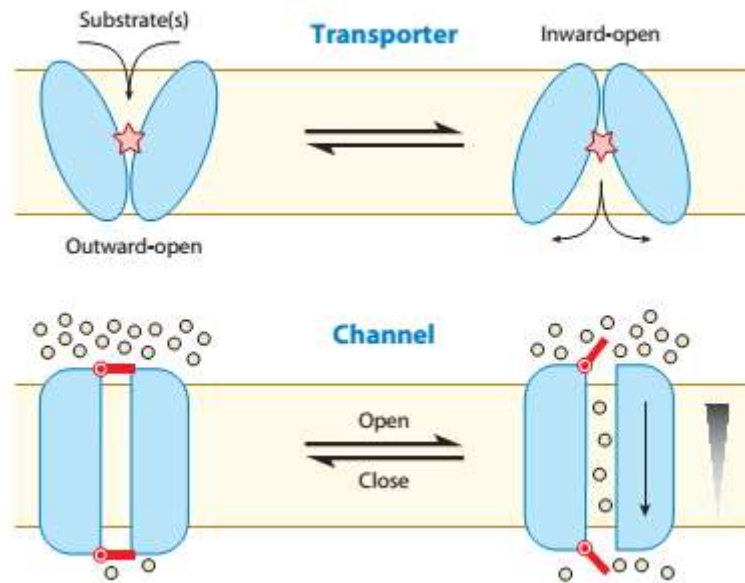
**Figura 2-3: Vía de degradación de las purinas en *A. nidulans*.** Sobre la izquierda se indican los transportadores involucrados en la captación de cada uno de los metabolitos. En gris se indican los genes involucrados en la síntesis de cofactores o modificaciones. No hay trabajos experimentales que sustenten la actividad de la guanina desaminasa. Extraído de Gournas *et al.*, 2011.

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

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

## 2.4 Transportadores de bases nucleotídicas en hongos

El transporte de nutrientes a través de las membranas celulares es esencial para todos los seres vivos. Casi todos los procesos de transporte transmembrana se llevan a cabo por proteínas integrales de membrana, que a veces funcionan asociadas con proteínas receptoras extracitoplasmáticas y/o proteínas reguladoras citoplasmáticas dependientes de energía (Saier, 2000). Existen dos grandes clases de proteínas transportadoras debido a sus diferencias estructurales y funcionales: los canales y los transportadores (*carriers*, *porters*, o permeasas) (Figura 2-4). Aunque también se han descrito transportadores tipo canales o canales tipo transportadores. Los canales median el transporte pasivo de solutos (usualmente iones) mediante difusión a través de un poro acuoso. El flujo de los iones es muy rápido y la frecuencia de apertura del poro está regulada por cambios en el potencial de membrana mediante la unión de un ligando específico o mediante restricciones mecánicas como la extensión de la membrana. Los transportadores experimentan cambios conformacionales reversibles pudiendo exponer su sitio de unión al sustrato alternativamente a un lado u otro de la membrana. En función de sus requerimientos energéticos se clasifican en: transportadores activos primarios, transportadores activos secundarios y facilitadores. Los transportadores activos transducen la energía libre almacenada en un gradiente electroquímico usualmente iones ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) (transporte activo secundario) o liberado por hidrólisis de ATP (transporte activo primario) en un gradiente de concentración de sustrato a través de una membrana. Los transportadores activos secundarios pueden ser simportadores (transportan sustratos e iones en la misma dirección) o antiportadores (transportan iones y sustratos en direcciones opuestas). Los facilitadores (uniportadores) requieren energía, median el movimiento de solutos a través de la membrana a favor de su gradiente de concentración. Los transportadores catalizan la captación o eflujo de la mayoría de los metabolitos (amino ácidos, bases nucleotídicas, nucleótidos, nucleósidos, azúcares, solutos nitrogenados, vitaminas, etc) (Diallinas, 2007; Conde *et al.*, 2010; Shi, 2013).



**Figura 2-4: Diferencias entre transportadores y canales.** El transportador (arriba) sufre cambios conformacionales para catalizar el movimiento transmembrana de moléculas de sustrato, ya sea cuesta arriba o cuesta abajo de su gradiente de concentración. Durante cada ciclo de transporte, la molécula de sustrato nunca se expone a ambos lados de la membrana de forma simultánea. El canal (abajo) una vez activado o abierto, permite el acceso de sustratos a ambos lados de la membrana de forma simultánea. Un canal sólo puede mediar la difusión de moléculas de sustrato por sus gradientes de concentración. Extraído de Shi, 2013.

El transporte de bases nucleotídicas a través de membranas biológicas es mediado por transportadores específicos en todos los Dominios aunque sólo unos pocos han sido identificados en detalle en bacterias, hongos y protozoarios (de Koning & Diallinas, 2000; de Koning *et al.*, 2005; Bellofatto, 2007; Pantazopoulou & Diallinas, 2007; Gournas *et al.*, 2008), pero también en plantas (Gillissen *et al.*, 2000; Desimone *et al.*, 2002; Maurino *et al.*, 2006) y mamíferos (de Koning & Diallinas, 2000; Hyde *et al.*, 2001; Gournas *et al.*, 2008). En las bases de datos hay cientos de secuencias homólogas a los transportadores de bases nucleotídicas conocidos, pero en la mayoría de los casos el rol fisiológico aún no se ha determinado. La importancia de estos transportadores radica no solo en proveer al organismo de compuestos esenciales, sino también en que son determinantes de la sensibilidad de los mismos frente a citotóxicos, análogos de purinas mutagénicos y drogas relacionadas con purinas (de Koning *et al.*, 2005; Frillingos, 2012; Kozmin *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2013).

Los hongos poseen por lo menos tres sistemas distintos para la captación de bases nucleotídicas: uno para adenina-hipoxantina-citosina, uno para ácido úrico-xantina y otro para uracilo. Mediante el clonado y secuenciación se ha podido demostrar que estos transportadores pertenecen a tres familias de proteínas evolutivamente distintas: la familia de transportadores de bases nucleotídicas y ascorbato (NAT), la familia simportadores catiónicos de bases nucleotídicas (NCS1), también llamada familia de transportadores relacionados con purinas (PRT), y la familia *AzgA-like* (Tabla 2-1). Todos son transportadores activos secundarios que catalizan el transporte

acoplado de purinas y protones en la misma dirección (simportadores) (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

**Tabla 2-1: Clasificación, especificidad y cinética de transportadores de bases nucleotídicas de hongos.** Extraído de Pantazopoulou & Diallinas, 2007.

Fungus/ transporter	Family	Physiological substrates [ $K_{mH}$ ( $\mu$ M)]	Other ligands < 100 $\mu$ M [ $K_{mH}$ ( $\mu$ M)]	Transport capacity
<i>A. nidulans</i>				
UapA	NAT/NCS2	X [7], UA [8]	2TX [63], 3MX [28], 8MX [100], OX [103], ALL*	H
UapC	NAT/NCS2	X[4], UA[136]	1MX [ $< 50$ ], 2TX [ $< 50$ ], 3MX [ $\sim 100$ ], 8MX [ $\sim 100$ ], OX [38], ALL*	M
AzgA	AZGA-like	HX[1.5], AD[3], GU[3]	PU [99], 6TPU [78], 2,6DAPU [2], 8AZX [11]	H
FcyB	NCS1/PRT	AD[7], HX[20], CY[20], GU[12]	ND	L
FurD	NCS1/PRT	UR [0.4]	THY [3.3], 1MUR [4], 2TUR [8], 4TUR [14], 5FUR [0.5], 6AZUR [2], 6MUR [15], X [94], UA [99]	H
<i>A. fumigatus</i>				
UapC	NAT/NCS2	X [6], UA [171]	8MX [50], 1MX [60], 2TX [65], 3MX [100], OX [103],	H
AzgA	AZGA-like	AD[3.5], HX[6], GU[8]	2,6 DAPU [3], PU [40], 6TPU [48], 9MGU [69]	M
FcyB <sup>†</sup>	NCS1/PRT	ND	ND	L
FurD <sup>†</sup>	NCS1/PRT	ND	ND	H
<i>S. cerevisiae</i>				
Fcy2p	NCS1/PRT	AD[1.8], HX[2.5], CY [1.8], GU[ND]	ND	H
Fur4p	NCS1/PRT	UR [2.5], URD [ND]	5FUR, 5FURD <sup>‡</sup>	H
<i>C. albicans</i>				
Xut1p	NAT/NCS2	X [4], UA [50]	2TX [30], 2TUA [97], 3MX [22], 6TUA [84], 8MX [80], 8AZX [55], OX [4],	H
Fcy21p	NCS1/PRT	HX[4], AD[16], GU[53], CY [4]	3MAD [22], 3DAZG [72], 5MCY [20], 5FCY [35]	H
Fur4p <sup>§</sup>	NCS1/PRT	ND	ND	H

X, xantina; UA, ácido úrico; AD, adenina, HX, hipoxantina; GU, guanina; CY, citosina; UR, uracilo; 1MX, 1-metilxantina; 2TX, 2-tioxantina; 3MX, 3-metilxantina; 8MX, 8-metilxantina; OX, oxypurinol; ALL, allopurinol; PU, purina; 6TPU, 6-tiopurina; 2,6DAPU, 2,6-diaminopurina; 8AZX, 8-azaxantina; THY, timina; 1MUR, 1-metiluracilo; 2TUR, 2-tiouracilo; 4TUR, 4-tiouracilo; 5FUR, 5-fluorouracilo; 6AZUR, 6-azauracilo; 6MUR, 6-metiluracilo; 9MGU, 9-metilguanina; 2TUA, 2-tio-ácido úrico; 6TUA, 6- tio-ácido úrico, 3MAD, 3-metiladenina; 3DAZG, 3-deazaguanina; 5MCY, 5-metilcitosina; 5FCY, 5-fluorocitosina; URD, uridina; FURD, 5-fluorouridina. H, M y L hacen referencia a alta, moderada o baja capacidad de transporte respectivamente (en base a valores de  $V_m$  o test de crecimiento. ND, no determinado. FcyB y FurD de *A.fumigatus* y Fur4p solo han sido identificadas *in silico*, su función no ha sido verificada.

## 2.4.1 Familia NAT

Las proteínas de la familia NAT, también llamada Simportadores Catiónicos de Bases nucleotídicas 2 (NCS2), son altamente hidrofóbicas, poseen entre 414 y 650 residuos aminoacídicos, en 12-14 dominios transmembrana con estructura de  $\alpha$ -hélices y dos dominios citoplasmáticos uno amino y otro carboxilo terminal. Actualmente se conoce la función y especificidad de cerca de 20 proteínas NAT derivadas de bacterias, hongos, plantas y mamíferos, mostrando que la mayoría son específicas en el simporte de xantina, ácido úrico o uracilo con  $H^+$ . Sin embargo, en primates los homólogos NAT (SVCT1 y SVCT2) transportan específicamente ácido L-ascórbico/ $Na^+$  (Diallinas & Gournas, 2008; Gournas *et al.*, 2008).



*A. nidulans* posee dos transportadores del tipo NAT llamados UapA y UapC que han sido extensamente caracterizados a nivel de la regulación transcripcional, regulación post-traducciona mediante endocitosis, acumulación en vacuolas en presencia de amonio, expresión durante en desarrollo sexual y asexual y relaciones estructura-función (Pantazopoulou & Diallynas, 2007).

UapA es una proteína de 574 aminoácidos, tiene gran afinidad y gran capacidad para el transporte de ácido úrico y xantina. También transporta análogos de xantina y ácido úrico especialmente aquellos que no tienen modificaciones en las posiciones N1-H1, N7-H7, o N9 del anillo purínico (Tabla 2-1) (Darlington & Scazzocchio, 1967; Arst & MacDonald, 1973; Arst & Scazzocchio, 1975; Scazzocchio & Arst, 1978; Diallynas *et al.*, 1998). UapC es una proteína de 580 aminoácidos muy similar a UapA (62% de identidad). Tiene gran afinidad por la xantina y moderada por ácido úrico pero también es capaz de transportar purinas no reconocidas por UapA, como la adenina y la hipoxantina aunque con baja afinidad y baja capacidad (de Koning & Diallynas, 2000). *Aspergillus fumigatus* posee un homólogo de UapA/C (61-63% de identidad) que ha sido caracterizado por expresión heteróloga en *A. nidulans*. Este transportador se parece a UapC con respecto a la afinidad y especificidad de sustrato pero tiene una alta capacidad de transporte, similar a UapA (Goudela *et al.*, 2008). El homólogo UapA/C de *Candida albicans* (47% de identidad) es un transportador de alta capacidad con alta afinidad por xantina y moderada por ácido úrico (Goudela *et al.*, 2005).

#### **2.4.2 Familia NCS1-PRT**

Los miembros de la familia NCS1 tienen entre 419 y 635 aminoácidos, los cuales muy probablemente constituyen 12 dominios con estructura de  $\alpha$ -hélices transmembrana. A diferencia de la amplia distribución de la familia NAT, los miembros de la familia NCS1 se encuentran sólo en hongos, procariontes y plantas, incluyendo transportadores de purinas, citosina, uridina, alantoína, piridoxina o tiamina. Ejemplos son: las permeasa de guanina-hipoxantina-citosina, FcY2p de *S.cerevisiae* y FcyB de *A. nidulans*, las permeasas de uracilo FurD (*A. nidulans*) y FuR4 (*S. cerevisiae*); CodB de *E. coli* que transporta citosina, AtPUP1 de *Arabidopsis thaliana* que transporta adenina y citosina y Mhp1 permeasa de benzilo-hydantoina de *Microbacterium liquefaciens* (Tabla 2-1) (Weber *et al.*, 1990; Danielsen *et al.*, 1992; Gillissen *et al.*, 2000; Shimamura *et al.*, 2008).

#### **2.4.3 Familia AzgA-like**

Los miembros de la familia AzgA-like tienen entre 423 y 594 aminoácidos y se predice entre 8 y 14 dominios transmembrana con estructura de  $\alpha$ -hélices. Incluye homólogos en procariontes, hongos y plantas. Hasta la fecha las proteínas cuya función ha sido demostrada son: las de los ascomycotas *A. nidulans* (AzgA) y *A. fumigatus* (AfAzgA); de la planta *Arabidopsis thaliana*

(AtAzg1 y AtAzg2), de la espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme *Borrelia burgdorferi* (BBB22 y BBB23) y recientemente se han caracterizado cuatro de estos transportadores en *E.coli* (PurP, YicO, YjcD y YgfQ) (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2008; Mansfield *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2012; Papakostas *et al.*, 2013). Las proteínas de hongos comparten hasta 35% de identidad con sus homólogos en bacterias y hasta un 44% con los de plantas. Entre los hongos secuenciados, todos los filamentosos y *Schizosaccharomycetes* sp tienen secuencias tipo AzgA mientras que ninguna proteína de este tipo se ha identificado en especies del subfilo *Saccharomycotina*. Las proteínas de Ascomycetes tienen 57-90% de identidad con AzgA y las de Basidiomycetes 50-67%.

La proteína AzgA de *A. nidulans* de 580 aminoácidos tiene 14 dominios transmembrana con estructura de  $\alpha$ -hélices. Presenta alta afinidad y alta capacidad para el transporte de hipoxantina, adenina y guanina. También transporta guanosina, 6-tioguanina, 8-azaxantina y el análogo tóxico 8-azaguanina. El homólogo AfAzgA (75% de identidad) es muy similar tanto en funcionalidad como en especificidad (Tabla 2-1) (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2008). AtAzg1 y AtAzg2 transportan adenina, guanina y 8- azaguanina, (Mansfield *et al.*, 2009). BBB22 y BBB23 son esenciales para el transporte de hipoxantina de *B. burgdorferi* y contribuyen en el transporte de adenina y guanina (Jain *et al.*, 2012). PurP y YicO transportan con alta afinidad adenina mientras que YjcD y YgfQ transportan hipoxantina y guanina. Además estos pares también difieren en el transporte de otros sustratos (Papakostas *et al.*, 2013).

## **2.5 Regulación transcripcional de los transportadores de purinas**

Muchas vías catabólicas de hongos son inducidas y reprimidas principalmente a nivel del inicio de la transcripción. La expresión de los transportadores de solutos que se utilizan como fuente de nitrógeno o carbono es un blanco primario de los circuitos de control transcripcional. Un excelente ejemplo de este tipo de regulación lo constituyen los tres transportadores de purinas de *A. nidulans*: AzgA, UapA y UapC.

### **2.5.1 Regulación de los transportadores de purinas de *A. nidulans* en respuesta a la fuente de nitrógeno y disponibilidad de purinas.**

La expresión de los genes *azgA*, *uapA* y *uapC* está regulada a nivel de la transcripción en respuesta a una represión metabólica por nitrógeno e inducción por purinas. El mismo mecanismo regula la expresión de la mayor parte de los genes que codifican las enzimas involucradas en el catabolismo de las purinas (Scazzocchio *et al.*, 1982; Scazzocchio, 1994). En ausencia de un inductor (ácido úrico, otras purinas o el inductor gratuito ácido 2-tioúrico) y en presencia de una fuente de nitrógeno no represora (urea, prolina), *azgA*, *uapA* y *uapC* se transcriben a un nivel

basal (bajo). Frente a inducción por purinas la acumulación de ARNm de *azgA*, *uapA* y *uapC* aumenta en el entorno de siete, quince y tres veces respectivamente (Amillis *et al.*, 2004; Cecchetto *et al.*, 2004). La presencia de amonio o glutamina (>5mM) reprime la expresión de las tres permeasas independientemente de la presencia de un inductor.

La inducción está mediada por la proteína reguladora positiva UaY. Este es un activador transcripcional que se expresa constitutivamente y en presencia de ácido úrico media la inducción de la mayoría de los genes involucrados en el metabolismo de las purinas en *A. nidulans* (Scazzocchio, 1994). Al igual que muchos activadores transcripcionales identificados en hongos, UaY pertenece a una familia de proteínas que se caracterizan por presentar en el extremo amino terminal un motivo de unión al ADN del tipo complejo binuclear de zinc, Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>. Mediante un análisis detallado basado en ensayos de retardo en gel EMSA, y *footprinting* de protección a la ADNasa I y de interferencia a la metilación se ha demostrado que UaY se une a los promotores como dímero en sitios de secuencia 5'-CGG-6X-CCG (Suarez *et al.*, 1995; Cecchetto *et al.*, 2012).

La represión por amonio está mediada por la inactivación del factor general de la transcripción AreA, el cual es necesario para la transcripción de más de 100 genes que codifican productos implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno en *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990). La proteína AreA pertenece a la familia de factores GATA (Scazzocchio, 2000) debido a que es capaz de unirse al ADN mediante un motivo de dedo de zinc del tipo Cys-2-Cys-17-Cys-2-Cys (Caddick *et al.*, 1986). Ensayos de retardo, *footprinting* de protección a la ADNasa I y de interferencia a la metilación han mostrado que el sitio de unión de AreA es 5'-HGATAR (Muro-Pastor *et al.*, 2004). AreA media la represión metabólica de nitrógeno, en ausencia de una fuente primaria el factor se une al promotor y se activa la expresión del gen en cuestión (la presencia de amonio o L-glutamina inhiben la actividad del factor) (Arst & Cove, 1973). El análisis molecular y funcional de mutantes de *areA* de unión al ADN y mutantes de los reguladores *cis* de los promotores de los genes blanco ha permitido dilucidar los mecanismos de reconocimiento específico del ADN y su efecto sobre la inducción de la transcripción (Kudla *et al.*, 1990; Ravagnani *et al.*, 1997).

La expresión de *azgA*, *uapA* y *uapC* es dependiente tanto de UaY como de AreA. Los estudios de mutantes han permitido concluir que la participación de ambos factores con los promotores de *uapA* y *uapC* es directa. Respecto a la regulación transcripcional de *azgA* se sabe que AreA podría participar directamente en la transcripción, actuar mediante un mecanismo de exclusión del inductor, o presentar ambos mecanismos de regulación (Cecchetto *et al.*, 2004).

### 2.5.2 Regulación de los transportadores de purinas de *A. nidulans* durante la germinación de conidiosporas.

Cuando las esporas asexuales (conidias) se encuentran en un ambiente favorable finalizan la latencia, se hinchan rápidamente, el núcleo se reorganiza y el tubo germinativo emerge hasta dar una hifa en crecimiento. La división nuclear acompañada de eventos morfológicos ordenados permiten el pasaje de la fase isotrópica de crecimiento a la fase polar (germinación) (Momany, 2002) (Figura 2-5). El término germinación hace referencia al conjunto de eventos tempranos necesarios para sensar y transmitir la señal de germinar. La germinación de las conidias involucra la activación transcripcional de genes que codifican transportadores además de genes constitutivos. La activación transcripcional de los genes *uapA*, *uapC* y *azgA* ocurre durante la fase isotrópica de crecimiento antes de la primera división nuclear, y conduce a la aparición de la correspondiente actividad de transporte de purinas. Esta activación transcripcional es independiente del factor específico de la vía, UaY. (Amillis *et al.*, 2004). El único requerimiento para la activación transcripcional *de novo* es la hidratación de los conidióforos latentes. Sin embargo la presencia de una fuente de carbono (glucosa o fructosa) en el medio de germinación es necesaria para la traducción de los ARN mensajeros de *uapA*, *uapC* y *azgA* en las proteínas transportadoras. La temperatura, pH, calidad de fuente de carbono (glucosa vs fructosa) o la presencia de diferentes fuentes de nitrógeno, incluyendo amonio y glutamina, que en estado micelial reprimen los genes involucrados en la utilización de nitrógeno, no presentan efecto en la activación transcripcional de los transportadores durante la germinación. Los genes *azgA* y *uapC* son independientes del factor AreA, mientras que *uapA* sí es dependiente del factor durante la germinación. Así los dos principales sistemas de regulación que controlan la transcripción de estos tres genes durante el estadio micelial (represión por nitrógeno e inducción por sustrato) se hacen funcionales luego de la germinación y luego de la primera división nuclear (Amillis *et al.*, 2004; Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

La activación transcripcional durante la fase isotrópica de crecimiento ha sido descrita para otros transportadores como *furD* (uracilo), *furA* (alantoato), *prnB* (prolina) cuya expresión es también independiente de los circuitos que operan en los estadios posteriores del desarrollo vegetativo. Mecanismos de control similares han sido identificados en *N. crassa* (Pendyala & Wellman, 1977). Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde proteínas sensoras altamente específicas activan los verdaderos transportadores (Forsberg & Ljungdahl, 2001), *A. nidulans* y posiblemente otros hongos filamentosos utilizan sus transportadores tanto para transportar los solutos como para sensar el ambiente (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

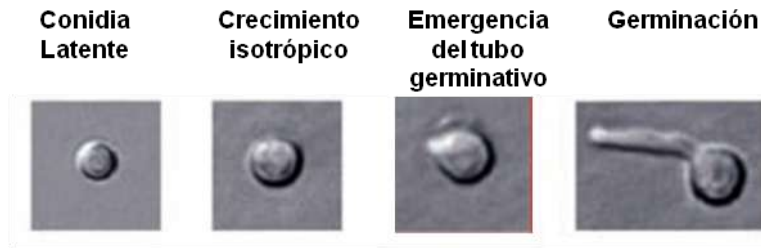


Figura 2-5: Pasos del proceso de germinación de *A. nidulans*. Extraído y modificado de Diallinas & Gournas, 2008.

## 2.6 Regulación post-traducciona l de los transportadores de purinas

Los cambios en las condiciones de crecimiento de los hongos además de afectar la regulación transcripcional de varios genes de transportadores conducen a una regulación post- traducciona l de los transportadores específicos mediante ubiquitinación (dependiente de Rsp5), endocitosis y degradación mediante la vía endosomal/vacuolar (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

### 2.6.1 Regulación a nivel del tráfico y endocitosis.

La mayoría de los transportadores son dirigidos a la membrana plasmática embebidos en vesículas exocíticas pero frente a determinadas condiciones los transportadores son re-dirigidos a las vacuolas para su degradación ya sea directamente a través de la vía de MVB (cuerpos multivesiculares, endosomas tardíos) o reciclados entre el Golgi, los endosomas y la membrana plasmática. Las señales que disparan la endocitosis pueden ser cambios en la fuente disponible de nitrógeno o carbono en el medio, stress o la presencia de algún sustrato en exceso (Hicke & Dunn, 2003; Dupre *et al.*, 2004; Sorkin & von Zastrow, 2009; Foley *et al.*, 2011).

Los transportadores son “fabricados” en el ribosoma e insertados (co-traducciona l) en las membranas del retículo endoplasmático (RE) (Meacock *et al.*, 2000; Dalbey & Chen, 2004; Perry & Lithgow, 2005). Transportadores mal plegados o transportadores que no son del hospedador, usualmente son retenidos en el RE y degradados mediante ERAD (*ER associated protein degradation*) (Meusser *et al.*, 2005). La salida del RE depende no sólo del correcto plegamiento del transportador y motivos de acción *cis*, también depende de factores proteicos que actúan en *trans* (proteínas *sec*, chaperonas del RE). Luego del RE los transportadores se dirigen en vesículas al Golgi y luego a la membrana plasmática, peroxisomas o vacuolas para su degradación. Proteínas específicas y cofactores regulan los diferentes pasos de formación y tránsito de las vesículas (Nishimura & Balch, 1997; Fromme & Schekman, 2005; Diallinas, 2007).

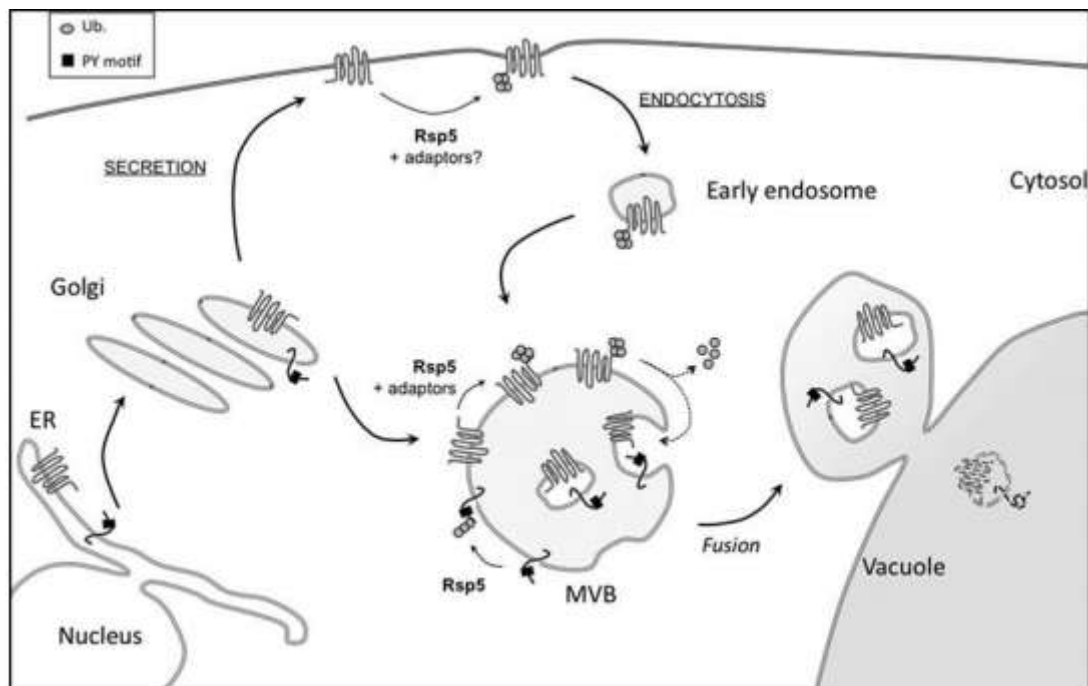
La endocitosis de transportadores, reciclado y degradación directa mediante la vía MBV/vacuolar depende de ciclos alternados de ubiquitinación y desubiquitinación, llamado “código de ubiquitina” (Figura 2-6) (Belgareh-Touzé *et al.*, 2008; Risinger & Kaiser, 2008; Lauwers *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae*, en respuesta a varias señales fisiológicas, distintos transportadores de membrana son ubiquitinados mediante la ligasa de ubiquitina Rsp5 para ser posteriormente removidos de la superficie celular o directamente desviados desde el Golgi al sistema endovacuolar (Hicke & Dunn, 2003; Dupre *et al.*, 2004; André & Haguenaer-Tsapis, 2004; Risinger *et al.*, 2006; Cain & Kaiser, 2011).

Rsp5 es una proteína esencial en la regulación de la expresión de proteínas de membrana a nivel post-traducciona. El tráfico dependiente de Rsp5 se ha estudiado en detalle en el transportador de uracilo Fur4p de *S. cerevisiae* (Dupre *et al.*, 2004). Cuando el nivel de uracilo que hay en el medio de crecimiento es bajo o nulo, el gen FUR4 es transcrito constitutivamente a niveles relativamente bajos, lo que permite la traducción de Fur4p y la translocación a la membrana plasmática. Mucha de la información que se tiene del mecanismo de endocitosis de Fur4p se ha obtenido mediante la utilización de la proteína silvestre marcada con GFP y mutantes (variantes de transporte) (Volland *et al.*, 1994; Galan, 1996; Galan & Haguenaer-Tsapis, 1997; Dupre *et al.*, 2004). Fur4p fusionadas a GFP marcan la membrana plasmática de las células de levadura pero algo de fluorescencia se detecta en vacuolas. No se detecta fluorescencia en el RE, Golgi, endosomas ni vesículas lo que sugiere que el flujo a la membrana plasmática y la aparente endocitosis es continuo, no permitiendo la acumulación del transportador en los compartimentos. La endocitosis y posterior degradación vacuolar refleja el *turnover* natural del transportador. La regulación post-traducciona por endocitosis y degradación vacuolar aumenta frente a condiciones adversas como ausencia de nitrógeno, carbono o fósforo, inhibición de la síntesis de proteínas mediante cicloheximida o la entrada en fase estacionaria de crecimiento (Volland *et al.*, 1994; Galan, 1996). La adición de altas concentraciones de uracilo al medio disminuye los niveles de transportador, principalmente porque se dispara rápidamente la degradación del transportador existente mediante ubiquitinación dependiente de Rsp5 y endocitosis (Séron *et al.*, 1999). Frente a condiciones adversas que aceleran el *turnover* del transportador también se dispara la degradación ribosomal, esto posiblemente provoca un aumento en el *pool* de uracilo de origen catabólico, que puede ser la principal señal de regulación post-traducciona de Fur4p. Para controlar el tráfico de Fur4p mediante inducción por uracilo se requiere la unión directa de uracilo al transportador. Un mutante de Fur4p con baja afinidad por uracilo no es capaz de internalizar en vacuolas los Fur4p sintetizados *de novo* en presencia de uracilo y el transportador es dirigido a la membrana plasmática. (Urban-Grima *et al.*, 1995; Séron *et al.*, 1999).

Fur4p tiene una secuencia N-terminal tipo PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina) que puede ser modificada mediante fosforilación de serinas, esta fosforilación es necesaria para la posterior ubiquitinación de las dos lisinas cercanas (K38, K41). La fosforilación de Fur4p en este sitio es dependiente de una kinasa homóloga a la caseína-kinasa I Yck1p/Yck2p. Para la endocitosis y degradación de Fur4p es necesaria su mono- u oligo-ubiquitinación (cadena de ubiquitinas enlazadas a K63) (Blondel *et al.*, 2004). Rsp5p reconoce sus sustratos mediante tres dominios WW (módulos de interacciones proteína- proteína de 40 aminoácidos) que reconocen motivos PY con la secuencia típica PPxY o LPxY. Muchos de los sustratos de RSP5 no tienen motivos PY por lo que dependen de proteínas adaptadoras. Varias de estas proteínas adaptadoras (Bsd2, Ear1, Ssh4,  $\alpha$ - arrestinas o proteínas tipo arrestinas) contienen estos motivos que sirven para facilitar la ubiquitinación de una proteína particular o un set de proteínas (Hetzema *et al.*, 2004; León *et al.*, 2008; Karachaliou *et al.*, 2013).

Utilizando un mutante de *rsp5* que no permite la ubiquitinación de Fur4p se observa que el transportador sintetizado *de novo* en presencia de uracilo es capaz de abandonar el Golgi e ingresar en la vacuola pero quedan mal ordenados en la membrana vacuolar. La correcta liberación al lumen vacuolar se logra mediante la fusión N-terminal de ubiquitinas. Cuando los transportadores mal ordenados en la membrana vacuolar son ubiquitinados mediante Rsp5 se logra la liberación al lumen (Blondel *et al.*, 2004).



**Figura 2-6: Tráfico de proteínas dependiente de Rsp5.** Los transportadores en la membrana son ubiquitinados por Rsp5, lo cual desencadena su internalización. Las proteínas ubiquitinadas son desubiquitinadas antes de internalizarse en las vesículas. Tras la fusión de los MVB con la vacuola, estas proteínas son degradadas por proteasas vacuolares. Extraído y modificado de Belgareh-Touzé *et al.*, 2008.

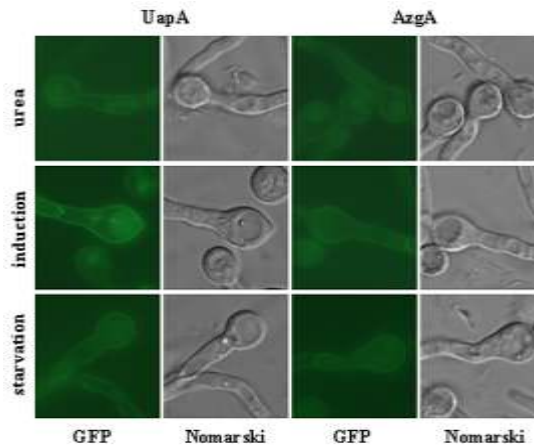
La expresión celular y subcelular de los transportadores de *A. nidulans* AzgA, UapA, UapC y FcyB se ha estudiado mediante el marcado de las proteínas a GFP. Análogamente a lo que ocurre en levaduras en el micelio vegetativo de *A. nidulans* los transportadores funcionales fusionados a GFP aparecen en la membrana plasmática y en vacuolas. Durante las etapas tempranas de la germinación luego de pasar por la membrana del RE, AzgA, UapA y UapC se localizan en la membrana plasmática, independientemente de la presencia o ausencia de purinas o el tipo de fuente de nitrógeno disponible. Luego de la germinación en ausencia de sustrato los transportadores se localizan en la membrana plasmática. En el caso de AzgA y UapA también se observa algo de degradación vacuolar. La adición de sustrato muestra un moderado aumento de AzgA y UapC asociada a la membrana plasmática mientras que en el caso de FcyB el transportador se localiza mayoritariamente en vacuolas. Con UapA se observa un aumento en la cantidad de transportador que se localiza en membrana pero además la fluorescencia en las vacuolas aumenta notoriamente (Figura 2-7), (Valdez-Taubas *et al.*, 2000; Pantazopoulou *et al.*, 2007; Vlanti & Diallynas, 2008). En presencia de sustrato UapA es endositada y dirigida a las vacuolas para su degradación a través de la vía de MVB. Este fenómeno no es disparado por un metabolito derivado del sustrato y es independiente de la inducción transcripcional por purinas. Los resultados obtenidos mediante el estudio de diversos mutantes sugieren que la señal que en presencia de sustrato produce aumento de la endocitosis es la propia translocación del sustrato a través de la proteína ya que ocurre mediante un mecanismo que sensa los cambios conformacionales asociados con el ciclo de transporte. UapA es el primer ejemplo de transportador que es regulado por sus sustratos mediante dos mecanismos antagonistas, inducción transcripcional y aumento de la endocitosis (Gournas *et al.*, 2010). Recientemente se ha mencionado que un mecanismo análogo regularía a AzgA (Karachaliou *et al.*, 2013).

El amonio (repressor transcripcional) provoca un aumento en la degradación vacuolar de AzgA, UapA, UapC y FcyB. (Valdez-Taubas *et al.*, 2004; Pantazopoulou *et al.*, 2007; Vlanti & Diallynas, 2008; Gournas *et al.*, 2010). El mecanismo que induce la endocitosis de UapA en presencia de sustrato se distingue claramente de la endocitosis inducida por amonio. Sin embargo se ha visto que ambos son dependientes de la ubiquitinación del transportador por la misma ubiquitina ligasa (HulA<sup>Rsp5</sup>) que actúa en el residuo de Lys (K572) mediante la acción de la proteína adaptadora tipo arrestina ArtA (Gournas *et al.*, 2010; Karachaliou *et al.*, 2013). El hecho de que la misma proteína controle la ubiquitinación de UapA y la endocitosis en respuesta tanto a la presencia de amonio como de sustrato aparenta una paradoja. La endocitosis provocada por amonio es una respuesta fisiológica que comparten probablemente todos los transportadores relacionados con el suministro de fuentes de nitrógeno secundarias, cuando el amonio que es una fuente primaria está presente no es necesario captar otros compuestos nitrógenados a través de sus transportadores específicos, los cuáles son internalizados y reciclados. Por el otro lado la



endocitosis inducida por sustrato es una señal altamente específica a cargo de un transportador particular. La presencia de sustratos de UapA no afecta la localización en membrana de transportadores específicos de otros sustratos como PrnB, y UapA no experimenta endocitosis en presencia de otros compuestos nitrogenados como urea, nitrato, prolina, aspartato, uracilo, adenina, hipoxantina, o alantoína (Gournas *et al.*, 2010; Karachaliou *et al.*, 2013). La diferencia más interesante entre la endocitosis de UapA inducida por amonio o sustrato es que la primera opera con versiones del transportador tanto activas como inactivas, mientras que la inducida por sustrato es absolutamente dependiente de la actividad de UapA (Gournas *et al.*, 2010). Si la arrestina responde a un amplio rango de señales como stress o cambios en la fuente de nitrógeno y carbono mediante desfosforilación, ubiquitinación, activación y reclutamiento de los transportadores en la membrana plasmática, como ha sido reportado recientemente (Macgurn *et al.*, 2011; Becuwe *et al.*, 2012; Merhi & André, 2012), la pregunta que queda por responder es: ¿cómo puede este modelo considerar el rol de las proteínas tipo arrestinas en la endocitosis inducida por sustrato de un transportador particular? Recientemente Karachaliou y colaboradores han propuesto un modelo en el cual la misma proteína adaptadora tipo arrestina (ArtA) es capaz de operar en respuesta a condiciones que generan un amplio rango de señales y que involucran distintos transportadores, pero también puede actuar específicamente sobre UapA cuando la proteína transporta activamente sus sustratos (Karachaliou *et al.*, 2013).

La represión post-traducciona l de transportadores de membrana mediante endocitosis es un proceso común en *S. cerevisiae* (Séron *et al.*, 1999). En varios casos se ha visto que únicamente los transportadores activos son sujetos a regulación por endocitosis. Ejemplos son la permeasa de manganeso Smf1 (Liu & Culotta, 1999), la permeasa de uracilo Fur4p (Blondel *et al.*, 2004), el complejo que media el transporte de hierro Fet3p-Ftr1 (Felice *et al.*, 2005) o la permeasa general de aminoácidos Gap1p (Risinger *et al.*, 2006).



**Figura 2-7: Microscopía de Epifluorescencia de UapA-GFP y AzgA-GFP.** Se observa la regulación de los transportadores bajo sus promotores fisiológicos en presencia de distintas fuentes de nitrógeno: urea, amonio (*repression*) y purinas (*induction*): ácido úrico (UapA-GFP) e hipoxantina (AzgA-GFP). La fluorescencia de la GFP se muestra a la izquierda y a la derecha se muestran las correspondientes figuras en Nomarski. Extraído y modificado de Pantazopoulou *et al.*, 2007.

## 2.7 Relaciones estructura-función de los transportadores de purinas de *Aspergillus nidulans*

Distintos enfoques, genéticos, bioquímicos y biofísicos han contribuido al conocimiento tanto de los mecanismos de reconocimiento de sustratos y transporte como del rol del acoplamiento a iones en el funcionamiento de los transportadores secundarios. *A. nidulans* es un sistema excelente para estudiar las relaciones estructura-función de los transportadores. Mutantes de las proteínas transportadoras pueden ser fácilmente seleccionados o construidos mediante métodos clásicos o genética reversa, y luego ser analizados bioquímicamente mediante estudios de cinética (Diallinas, 2007; Diallinas & Gournas, 2008).

La permeasa UapA, es uno de los transportadores eucariotas más estudiados en lo que respecta a las relaciones estructura-función. Mediante el análisis de más de 100 mutantes, especialmente aquellos que presentan afectada la especificidad o cinética de transporte, se ha podido establecer la importancia funcional de varios residuos (Diallinas & Gournas, 2008; Gournas *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010; Amillis *et al.*, 2011). Cuatro residuos aminoácidos sumamente conservados (Q85, E356, D388 y N409) son indispensables para la función. Entre estos residuos, fue propuesto que E356 forma contactos directos con el anillo purínico, en base al hecho de que una mutación específica (E356D) aumenta dramáticamente la unión a los sustratos fisiológicos pero reduce su transporte (Papageorgiou *et al.*, 2008). Un segundo aminoácido parcialmente conservado, Q408,

ha sido propuesto como involucrado en el contacto directo con los sustratos, porque su sustitución con prolina reduce dramáticamente la unión a los sustratos fisiológicos, pero principalmente porque su sustitución por glutamato le confiere la capacidad de reconocer otros sustratos como hipoxantina y guanina (Koukaki *et al.*, 2005). Además, análisis cinéticos utilizando distintos análogos de xantina como inhibidores competitivos de la captación de xantina sugieren que E356 y Q408 pueden interactuar con N1H y N9 o N7H del anillo purínico (Papageorgiou *et al.*, 2008). Otros cuatro residuos absoluta o parcialmente conservados, H86, G411, T416 y R417 han sido también identificados como determinantes de la actividad de transporte de UapA (Goudela *et al.*, 2005; Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou & Diallinas, 2006). Es importante destacar que mediante genética reversa y análisis mutacional con *Cys-scanning* del homólogo de *E.coli* XanQ se ha visto que los mismos residuos que son esenciales para la función de UapA son también críticos para la actividad del transportador bacteriano (Frillingos, 2012). Por otro lado se ha determinado que mutaciones en nueve residuos que no se conservan o están parcialmente conservados, N71, Q113, F406, A441, V463, A469, R481, T526 y F528, distribuidos en variadas regiones de UapA, aumentan el perfil de sustratos del transportador. Sin embargo, ninguno de estos residuos es crítico para la unión o eficiencia del transporte (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010).

Previo al modelo tridimensional que se acepta actualmente, la estructura predicha para los miembros de la familia NAT consistía en 12 segmentos transmembrana (STMs) putativos con dos dominios citoplasmáticos uno carboxilo terminal y otro amino terminal. Se destaca la presencia de dos motivos sumamente conservados denominados “NAT signature motif” (Q/E/P)-N-X-G-X-X-X-X-T-(R/K/G), localizado en la región anfipática ubicado justo corriente arriba de STM9 y el motivo QH en el medio del STM1 (Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou & Diallinas, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008). Actualmente disponemos de un modelo tridimensional de UapA, construido en base al cristal del transportador de uracilo de *E.coli* UraA (Lu *et al.*, 2011) y alineamientos múltiples de proteínas NAT de función y especificidad conocida (UapC, Lpe1, SNBT1, SVCT1, SVCT2, XanQ, XanP, YgfU, PucJ, PyrP y RutG). Además mediante la implementación de una variedad de metodologías computacionales, simulación de mecanismos moleculares y enfoques de relaciones cuantitativas estructura-actividad (SAR), se propuso un modelo para el complejo UapA-xantina. Análisis fisiológicos, celulares y genéticos de los mutantes relevantes previamente estudiados y algunos diseñados racionalmente son el sustento del modelo y han permitido verificar la topología de los residuos que afectan la función y especificidad del transportador (

**Tabla 2-2** (Amillis *et al.*, 2011).

El modelo tridimensional de la estructura de UapA (Figura 2-8) consiste en 14 segmentos transmembrana, que mayoritariamente adoptan una estructura secundaria de hélice. La estructura está espacialmente arreglada en dos dominios denominados núcleo y puerta, el núcleo está formado por los segmentos 1-4 y 8-11 y el puerta está formado por los segmentos 5-7 y 12-14. Las hélices transmembrana están conectadas por grandes *loops*, la mayoría de los cuales se corresponden con largas inserciones en las secuencias del alineamiento, lo que dificulta la obtención de la conformación precisa en esta parte del transportador. La mayoría de los residuos ionizados en la superficie de la proteína se encuentran en el lado citoplasmático-periplasmático o a lo largo de los poros proteicos en el interior de la proteína. Las cargas positivas están mayoritariamente concentradas en los *loops* del lado citoplasmático (Kosti *et al.*, 2012).

En el modelo propuesto para el complejo UapA-xantina el sitio de unión al sustrato está formado por las cadenas polares de los residuos E356 (STM8) y Q408 (STM10) y la cadena central de A407 (STM10) y F155 (STM3). El modelo también predice varias interacciones polares entre STM1-STM10, STM1-STM3 y STM8-STM10 que parecen ser críticas para la actividad de transporte de UapA (Figura 2-9 y Figura 2-8). La importancia de STM3 y la interacción de STM1 con STM3 están sustentadas genéticamente mediante la caracterización de revertantes de la mutación H86D (STM1), que se encuentran en M151 (STM3). Es interesante que previo al modelo tridimensional ya se aceptaba que todas las mutaciones específicas que no afectan la cinética se encontraban fuera de STM1, STM3, STM8 y STM10 (todos los residuos esenciales o críticos se encuentran en STM1, STM3 y STM10), y que mutaciones específicas definían filtros de selectividad o puertas dinámicas que permitían o restringían el acceso del sustrato al actual sitio de unión (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010).

Utilizando cálculos de acoplamiento se identificó la posible trayectoria del sustrato orientada hacia el citoplasma (D360, A363, G411, T416, R417, V463 y A469), conectando el sitio de unión con el citoplasma, así como una posible puerta hacia el exterior que conduce hacia el sitio de unión al sustrato (Kosti *et al.*, 2012).

Como sustento del modelo es importante destacar que los residuos E356 (STM8) y Q408 (STM10) en UapA se corresponden con los residuos E241 y E290 de UraA, los cuales se ha visto que interactúan con el uracilo. Así tanto en UapA como en UraA el sitio de unión al sustrato se encuentra formado por residuos específicos de STM3, STM8 y STM10 y una conclusión similar se obtuvo con el modelo tridimensional de la permeasa XanQ (Karena & Frillingos, 2011; Lu *et al.*, 2011).

Tabla 2-2: Resumen de los residuos críticos para la función de UapA. Extraído de Kosti *et al.*, 2012.

Allele	Location	Core Domain	Gate Domain	Effect on transport capacity <sup>1</sup>	Major Substrate binding site	Trajectory (t) or Gate (g)	Enlarged specificity	Critical polar interactions
Q85	TMS1	+	-	+	-	-	-	T416
H86	TMS1	+	-	+	-	-	-	N409
Q113	TMS1-2 loop	+	-	+ or -	-	-	yes	-
M151	B3/TMS3	+	-	+/-	-	-	-	-
S154	TMS3	+	-	+/-	-	-	-	-
F155	TMS3	+	-	-	yes <sup>2</sup>	-	-	-
E356	TMS8	+	-	+	yes	-	-	-
D360	TMS8	+	-	+	-	t	-	T405, N410
A363	TMS8	+	-	-	-	t	-	-
F406	B10/TMS10	+	-	-	-	-	yes	-
A407	TMS10	+	-	+	yes <sup>2</sup>	-	-	-
Q408	TMS10	+	-	+	yes	-	yes <sup>3</sup>	-
N409	TMS10	+	-	+	-	-	-	H86
G411	TMS10	+	-	+ or -	-	t	-	-
T416	TMS10	+	-	-	-	t	-	Q85
R417	TMS10	+	-	-	-	t	-	-
A441	TMS11-12 loop	-	+	-	-	-	yes	-
V463	TMS12	-	+	-	-	t	yes	-
A469	TMS12	-	+	-	-	t	yes	-
R481	TMS13	-	+	-	-	-	yes	-
T526	TMS14	-	+	-	-	g	yes	-
G527	TMS14	-	+	+	-	g	yes	-
F528	TMS14	-	+	-	-	g	yes	-

STM: Segmentos transmembrana; B: Hojas beta entre STM:

<sup>1</sup>“-”: ningún efecto importante en  $V_{máx} > 50\%$ , “+”: efecto importante en  $V_{máx} < 10\%$ , “+/-” or “-”: dependiendo de la sustitución específica.

<sup>2</sup>Evidencia de la participación en la unión al sustrato mediante las interacciones de la cadena peptídica central.

<sup>3</sup>Q408E, confiere la habilidad de unir hipoxantina y guanina, pero no conduce a su transporte. Q408 en combinación con mutaciones del dominio puerta conduce a una afinidad de unión alta-media y transporte de todas las purinas y uracilo.

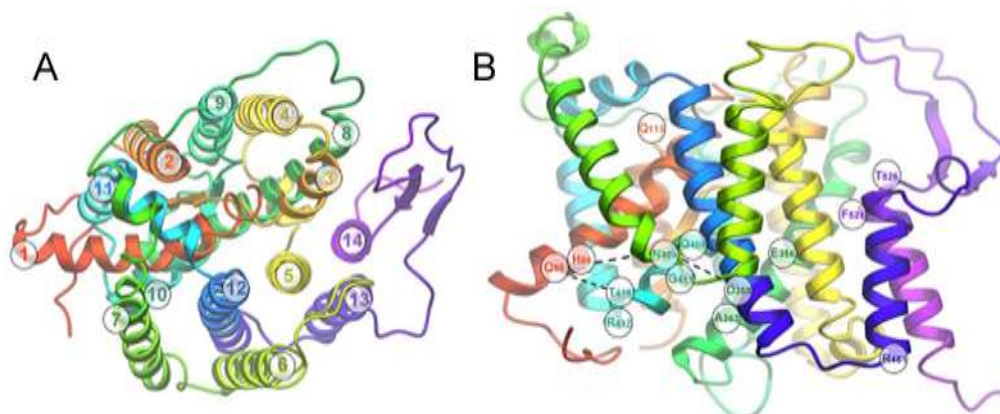
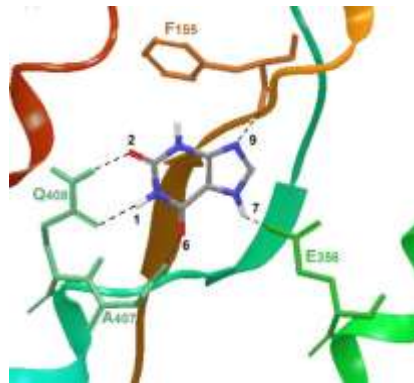


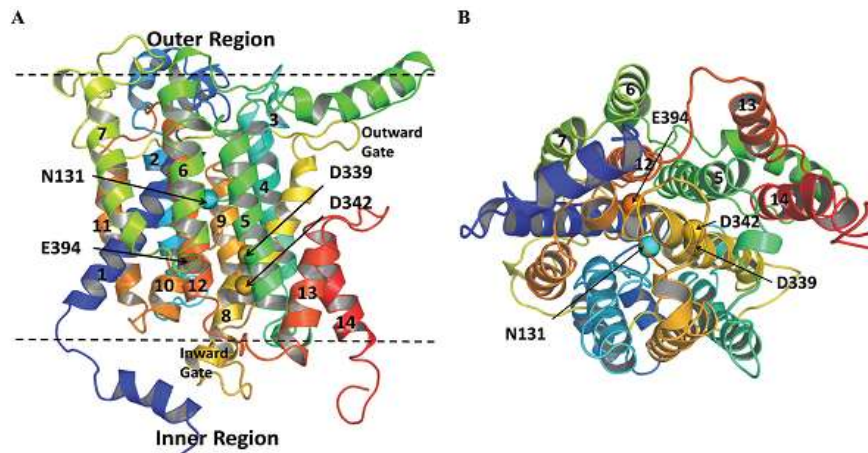
Figura 2-8: Estructura teórica de UapA. Modelo tridimensional de UapA, las hélices transmembrana se indican con números. A) Vista desde arriba B) se muestran los residuos críticos para la función del transportador. Extraído de Kosti *et al.*, 2012.



**Figura 2-9: Interacciones UapA-sustrato.** Representación esquemática de posible interacción xantina-UapA. Extraído de Kostí *et al.*, 2012. Por más información ver doi:10.1371/journal.pone.0041939.g003

Mucho menos se conoce de las relaciones estructura función de los transportadores de las otras familias (NCS1-PRT y *AzgA-like*) aunque recientemente se ha publicado un modelo tridimensional de FcyB y *AzgA* y se ha identificado la función de algunos residuos de estas proteínas (Kryptou *et al.*, 2012; Kryptou *et al.*, 2014).

El modelo de FcyB, construido en base a la estructura cristalográfica de Mhp1 permeasa de benzilo-hydantoina de *Microbacterium liquefaciens*, consiste en 12 segmentos transmembrana (hélices) y dos dominios citoplasmáticos: uno dominio amino y otro carboxilo terminal. Estructuralmente se distingue un dominio núcleo de 10 STMs compuesto de dos repetidos invertidos (STM1-5 y STM 6-10) y dos STM adicionales. El núcleo también puede verse como dos subdominios, el primero formado por los STMs 1, 2 y 6 y el segundo compuesto por los STMs 3, 4, 8 y 9 y vinculados a las hélices flexibles STM5 y STM10. El sitio de unión al sustrato predicho se localiza en el espacio comprendido entre los dos subdominios del núcleo. El modelo sumado al estudio de mutantes ha permitido identificar 8 residuos implicados en la especificidad, estructura y funcionalidad del transportador (Shimamura *et al.*, 2008; Kryptou *et al.*, 2012).



**Figura 2-10: Estructura teórica de AzgA.** Se muestran los residuos críticos para la función del transportador. A) Las hélices transmembrana se indican con números y los planos de la membrana con línea punteada. B) Vista desde arriba del mismo modelo. El sitio de unión al sustrato se encuentra entre los dominios núcleo y puerta. Extraído de Kryptou *et al.*, 2014.

El modelo propuesto para la proteína AzgA, publicado durante la escritura de este manuscrito, fue construido en base al cristal del transportador de uracilo de *E. coli* UraA (27% de identidad y 15% de cobertura). El modelo es muy similar al de UapA: 14 segmentos transmembrana mayoritariamente alfa hélices y dos dominios citoplasmáticos, uno amino y otro carboxilo terminal. Se distingue un núcleo compacto de 8 STMs compuesto de dos repetidos invertidos (STM1-4 y STM 8-11) y un dominio puerta flexible (STMSs 5-7 y 12-14). El sitio de unión al sustrato se predice entre los dominios puerta y núcleo. Con el modelo, cálculos de acoplamiento, simulaciones de dinámica molecular y el análisis de mutantes, se identificaron algunos residuos con un rol crítico para el transporte o unión del sustrato, Asn131 (STM3), Asp339, Val393 y Glu394 (STM10) (Figura 2-10) (Kryptou *et al.*, 2014).

A pesar de que estructuras de alta resolución de proteínas de membrana están actualmente emergiendo, la hidrofobicidad y la naturaleza metaestable de los transportadores dificulta su estudio mediante cristalografía de rayos X tradicional o NMR. Incluso en los casos con estructuras resueltas, el hecho de que los transportadores necesiten ser removidos de su ambiente natural (membrana) para estudiar su estructura puede provocar artefactos, especialmente si no hay estudios funcionales *in vivo* que complementen la información obtenida. Es por esto que los datos estructurales obtenidos mediante cristalografía deben ser integrados con estudios genéticos, bioquímicos y biofísicos, además de métodos computacionales, para determinar los mecanismos de transporte a nivel molecular.



## **2.8 *Aspergillus nidulans* y las herramientas moleculares para el estudio de transportadores de purinas**

*Emmericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*) es un ascomycota ampliamente utilizado como modelo de investigación. Su genoma haploide, crecimiento rápido y requerimientos nutricionales simples son características que facilitan su utilización en el laboratorio. El desarrollo de un sistema de transformación eficiente en este eucariota y la existencia de cepas modificadas permite la aplicación de diversas técnicas moleculares como el clonado de genes por complementación de función, la inactivación de genes por recombinación homóloga, introducción de mutaciones puntuales, cambio de promotores, agregado de marcadores proteicos o “tags” de manera simple y rápida. El genoma de *A. nidulans* está completamente secuenciado disponible mediante el Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi>) (Galagan *et al.*, 2005).

*A. nidulans* es el organismo donde se ha estudiado en mayor detalle tanto el catabolismo como el sistema de captación de purinas. Todos los genes estructurales y reguladores involucrados incluyendo los cinco genes que codifican para las permeasas de purinas han sido estudiados e identificados. Además *A. nidulans*, al contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae* puede utilizar purinas como fuente de nitrógeno, lo que determina que en un contexto genético adecuado, cualquier mutación que afecte un transportador de purina se verá reflejada en un fenotipo discernible. Mutantes específicos de transportadores pueden ser seleccionados y caracterizados mediante simples test de crecimiento en purinas o análogos tóxicos de purinas (utilizando un contexto genético donde el resto de los transportadores no sean funcionales). Las mutaciones en los transportadores pueden ser diferenciadas fácilmente en las que afectan la topogénesis del transportador o las que afectan la funcionalidad del mismo, ya sea la capacidad, especificidad o afinidad por el sustrato.

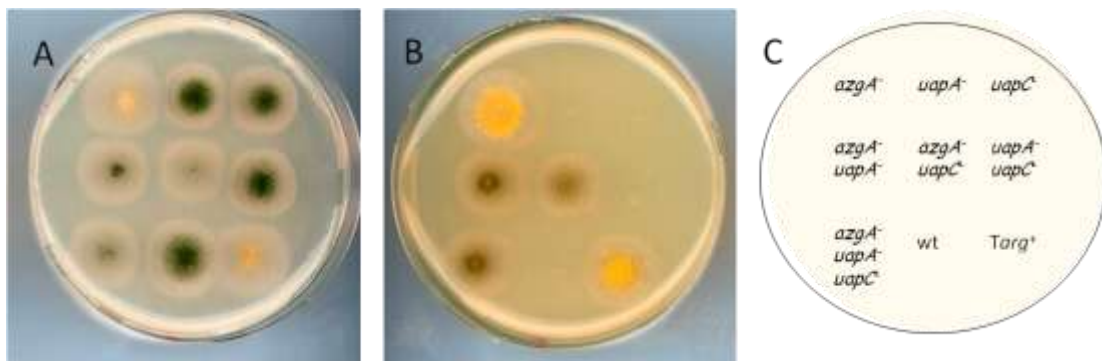
### **2.8.1 Mutaciones**

*A. nidulans* es un excelente sistema para seleccionar mutaciones que afecten la cinética o especificidad de varios transportadores. En mutantes termo o criosensibles puede estar afectada tanto la topogénesis como la cinética de un transportador específico. Los mutantes que tienen afectada la afinidad pueden ser seleccionados como mutantes con deficiencias en la captación y que por tanto sean incapaces de crecer (en medio apropiado) con bajas concentraciones de sustrato, pero sí puedan crecer con mayores concentraciones del mismo. Mutaciones de especificidad pueden ser identificadas mediante la selección de los mutantes que sean capaces de crecer en un sustrato dado pero no en otro, o mutantes que hayan adquirido resistencia a un análogo tóxico pero continúen creciendo en los sustratos fisiológicos. Mutaciones revertantes

pueden ser seleccionadas y utilizadas para comprender la interacción entre dominios. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas primarias de un transportador y las de sus homólogos permite el diseño racional de mutaciones sitio dirigidas. Estas mutaciones generalmente apuntan a residuos conservados o semiconservados con propiedades fisicoquímicas particulares, como la carga de aminoácidos o prolinas o glicinas dentro de dominios transmembrana (Diallinas, 2007).

### 2.8.2 Test de crecimiento

Varios mutantes de transporte tienen un fenotipo de crecimiento visible. Cuando el metabolito que se transporta es necesario para el crecimiento (como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas, etc) la falta de transporte puede dar distintos fenotipos visibles. Además del crecimiento normal o la falta total de crecimiento, se pueden observar fenotipos intermedios de crecimiento inferior al del tipo silvestre, característico de mutantes en transportadores que pueden incorporar metabolitos de interés por sistemas secundarios de transporte. En los casos donde la falta de transporte produce un fenotipo no visible, el uso de análogos tóxicos o mutaciones específicas que producen otros defectos metabólicos, se pueden utilizar para obtener un fenotipo discernible. Por ejemplo, la falta de transporte de hipoxantina también puede verse como resistencia a la 8-azaguanina, un análogo altamente tóxico (Figura 2-11).



**Figura 2-11: Test de crecimiento como herramienta para el estudio de transportadores de purinas.** Se muestra el crecimiento en hipoxantina (A) y urea con 8- azaguanina (B) de las cepas referenciadas en C. *azgA<sup>-</sup>*: *azgA4*, *uapA<sup>-</sup>*: *uapA24*, *uapC<sup>-</sup>*: *uapC201/401*, wt: *pabaA1*, *Targ<sup>+</sup>*: cepa *azgA4 uapA24 uapC201/401 argB2* transformada con el plásmido pFB39(*argB<sup>+</sup>*). Extraído de Cecchetto, 2004.

### 2.8.3 Ensayos de cinética de transporte

Debido a que los transportadores tienen un sitio principal de unión al sustrato que en cada ciclo de transporte interacciona específicamente con una única molécula de sustrato (similar a enzimas), el

transporte puede ser analizado mediante cinética de Michaelis-Menten. Los ensayos de transporte permiten analizar la cinética de un transportador específico mediante la determinación de los parámetros  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , y permiten la caracterización de perfiles de sustratos específicos mediante ensayos de competencia. La constante  $K_m$  da una idea de la afinidad del transportador por su sustrato, cuanto mayor es  $K_m$  menor es la afinidad. La velocidad máxima estima el número de centros activos, depende de la cantidad de transportador presente y la capacidad de transportar del mismo, es decir la velocidad con la que se transporta el sustrato.

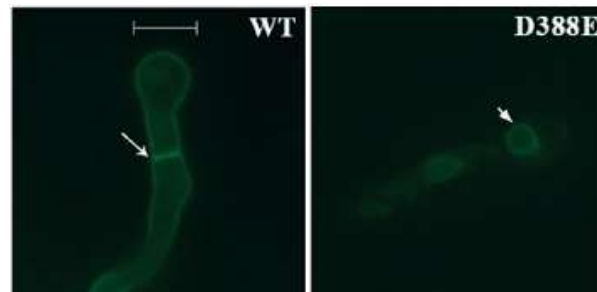
Estas mediciones o estos ensayos son fáciles de llevar a cabo utilizando sustratos radioactivos en organismos que pueden crecer en suspensiones celulares homogéneas. En organismos como los hongos filamentosos hay algunas dificultades técnicas adicionales relacionadas con la malla de micelio. En *A. nidulans* este problema ha sido solucionado utilizando conidias al final de la fase isotrópica y antes de que hayan empezado a germinar (cuando aparece el tubo germinativo). La utilización de conidias individuales permite expresar las mediciones de transporte por conidias viables y tiene la ventaja adicional de que la mayoría de los transportadores muestran el máximo de expresión en esta etapa (Diallinas *et al.*, 1995; Tazebay *et al.*, 1995; Amillis *et al.*, 2004; Kryptou & Diallinas, 2014).

#### **2.8.4 Visualización mediante microscopía de fluorescencia**

El marcado de transportadores con proteínas fluorescentes (GFP, RFP, etc) constituye una excelente herramienta para el seguimiento *in vivo* del destino de los transportadores (Valdez-Taubas *et al.*, 2000; Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou *et al.*, 2007). Detectar la topología del transportador es un prerrequisito para clasificar las diferentes mutaciones que afectan estructura/topología y las que afectan la cinética en sí misma. Es posible utilizar tanto epifluorescencia como microscopía confocal, la primera es más fácil de usar y es suficiente para sacar conclusiones. Varios transportadores han sido marcados en el extremo C-terminal, en algunos casos, el marcado con GFP es absolutamente “silencioso” con respecto a la función del transportador (AzgA, UapA y UapC) (Valdez-Taubas *et al.*, 2000; Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou *et al.*, 2007), mientras que en otros el marcado puede afectar parcialmente la cinética del transportador (PrnB) (Tavoularis *et al.*, 2003). En el último caso el problema puede resolverse o disminuir mediante la utilización de *linkers* de aminoácidos entre la GFP y el transportador (Toews *et al.*, 2004; Koukaki *et al.*, 2005).

Estudios de este tipo han mostrado que los transportadores se localizan principalmente en la membrana plasmática, en el área de los septos y las vacuolas, que aparecen como marcas corticales, anillos citoplasmáticos, o gránulos (Figura 2-12). La localización subcelular de las proteínas fusionadas se puede determinar por comparación con la localización con otras proteínas

fusionadas con señales conocidas o directamente por comparación con colorantes fluorescentes vitales como FM4-64 CMAC para vacuolas, ER-Tracker para retículo endoplasmático, entre otros (Hickey, 2009).



**Figura 2-12: Microscopía de epifluorescencia como herramienta para el estudio de transportadores.** Se ejemplifica con una cepa UapA-GFP silvestre (WT) y una UapA-GFP mutante (D388E) que presenta problemas en el tráfico. La flechas indican septos y las puntas de flecha indican estructuras tipo anillo que se corresponden con el retículo endoplasmático. Extraído y modificado de Diallinas & Gournas, 2008.

### 2.8.5 Ciclo de vida de *A. nidulans*

El ascomycota *E. nidulans* presenta un ciclo de vida compuesto por tres fases de desarrollo: asexual, sexual y parasexual (Figura 2-13).

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

En la fase de reproducción sexual se forma un cuerpo de fructificación de forma esférica llamado cleistotecio, en su interior se encuentran una gran cantidad de sacos denominados ascos, que

contienen las esporas sexuales o ascosporas. El proceso de formación del cleistotecio comienza cuando dos núcleos haploides se congregan para dar lugar a la hifa ascogénica. Luego del evento de fertilización, una meiosis y dos mitosis se suceden para dar lugar a la formación del asco maduro. Los cuatro núcleos producidos por meiosis se dividen mitóticamente para generar 8 núcleos haploides que se dividen de nuevo (mitosis sin división celular) para dar lugar a 8 esporas binucleadas (haploides). Cada cleistotecio se forma a partir de un único evento de fertilización, por lo que en las ascosporas se segregan los caracteres parentales. *A. nidulans* es homotálico por lo que todos los pasos del ciclo sexual pueden ocurrir en un solo micelio sin necesidad de un “compañero sexual”, esto permite que una única cepa pase por un ciclo de automeiosis. Por otro lado, si dos cepas de *A. nidulans* entran en contacto, se anastomosan fácilmente y forman filamentos heterocarióticos. Durante el ciclo sexual, la fusión puede tener lugar entre dos núcleos diferentes (cleistotecio cruzado) o entre dos núcleos de un mismo progenitor. La proporción de cleistotecios cruzados varía según las cepas. La utilización de cepas con auxotrofías complementarias aumenta la proporción de cleistotecios provenientes de la fecundación de núcleos distintos.

Este organismo también tiene un ciclo parasexual con alternancia de fases haploides y diploides. El micelio heterocariótico puede dar lugar espontáneamente a una espora diploide, el micelio diploide crece como la cepa haploide, pero no es una forma estable y vuelve fácilmente al estado haploide. El proceso de haploidización se inicia con el diploide que durante la formación de nuevas conidias segrega cromosomas y termina con la formación de haploides recombinantes. Esta fase, permite asignar genes a los distintos cromosomas usando mutaciones e identificar traslocaciones (Pontecorvo *et al.*, 1953; Kafer 1958; Clutterbuck, 1974).

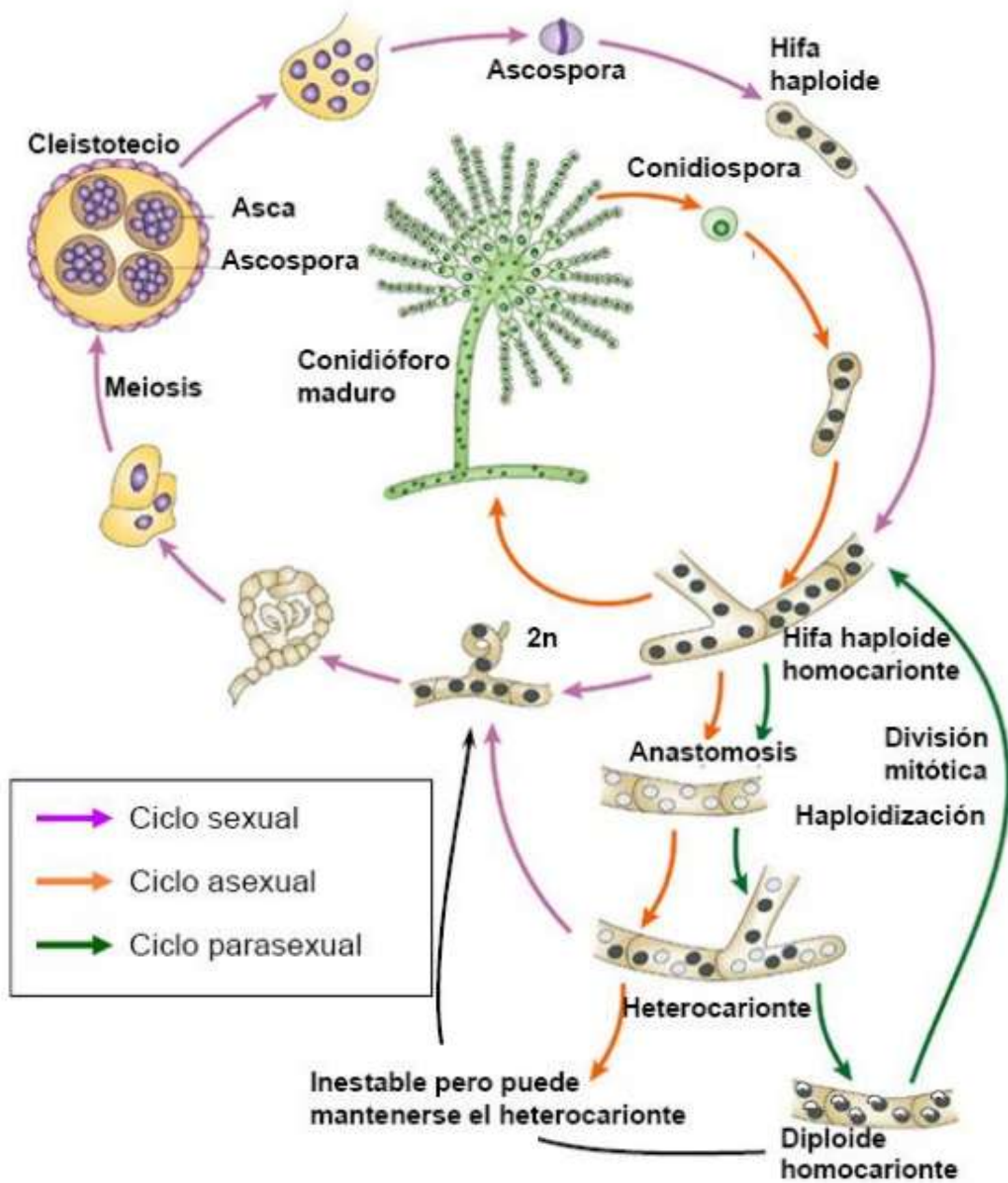


Figura 2-13: Ciclo de vida de *A. nidulans*. Extraído de Casselton & Zolan, 2002.

## 2.9 Transportadores de purinas en basidiomycotas degradadores de madera.

El hábitat de los hongos degradadores de madera es muy rico en fuente de carbono pero extremadamente pobre en otros nutrientes, particularmente fuente de nitrógeno (Carlile, 1994). El nitrógeno constituye tan sólo el 0.01-0.3% de la madera (en peso seco). Teniendo en cuenta

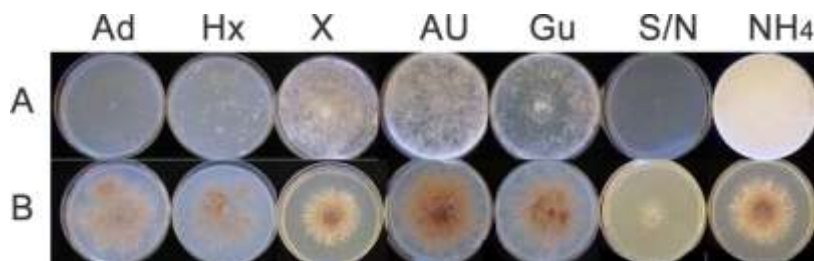
además, que son pocos los hongos degradadores de madera que pueden utilizar nitrato, se ha postulado que el nutriente limitante en la madera es el nitrógeno (Park, 1976). En un medio tan pobre como es la madera, las purinas se convierten en potenciales fuentes de nitrógeno, su utilización depende de que el organismo cuente con los transportadores (que permiten su entrada a la célula) y las enzimas catabólicas correspondientes. Hasta la fecha los únicos datos respecto al transporte y catabolismo de purinas en basidiomycetes provienen de análisis *in silico* del genoma de organismos secuenciados. El número de genomas de hongos ha aumentado notoriamente en los últimos años como resultado de los proyectos “1000 Fungal Genomes”, “Survey of lignocellulolytic capabilities over the order Polyporales (Fungi, Basidiomycetes)” y “Saprotrophic Agaricomycotina Project” (SAP). A la fecha hay disponibles en el Joint Genome Institute aproximadamente 90 genomas de basidiomycotas (<http://genome.jgi-psf.org>). En muchos de ellos hemos constatado la presencia de genes que codifican proteínas con alta homología con los transportadores de purinas conocidos.

Previamente nuestro grupo de trabajo, ya había demostrado que los basidiomycotas degradadores de madera *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens* pueden utilizar purinas como fuente de nitrógeno (Figura 2-14), y mediante análisis *in silico* en el genoma de *P. chrysosporium* había identificado dos secuencias (*phU* y *phZ*) que codifican proteínas con alta homología con UapA/C y AzgA (Libisch, Cerdeiras y Cecchetto, resultados no publicados).

*P. chrysosporium*, al igual que otros hongos degradadores de madera tiene una variedad de aplicaciones potencialmente útiles para la industria debido a su capacidad de degradar la lignina y otros compuestos orgánicos recalcitrantes. Constituye el organismo modelo para los hongos degradadores de madera siendo el primer basidiomycota secuenciado (Martinez *et al.*, 2004; Wymelenberg *et al.*, 2005; Vanden Wymelenberg *et al.*, 2006). *P. atropurpurascens* es un organismo aislado de nuestra región, también es capaz de degradar la lignina y su sistema ligninolítico presenta similitudes y diferencias con el de *P. chrysosporium* (Ibáñez, 2010). Debido a que el genoma de *P. atropurpurascens* no se encuentra secuenciado, para evidenciar la presencia de transportadores de purinas se utilizaron *primers* degenerados (diseñados a partir de las zonas conservadas de las proteínas conocidas) y se identificó la presencia de un transportador similar a AzgA (Barraco Vega, Richero, Libisch, Cerdeiras y Cecchetto, resultados no publicados). La regulación a nivel transcripcional de los genes *phZ* y *phU* que codifican los transportadores de purinas de *P. chrysosporium* fue analizada determinándose que: i) *phU* es inducido en presencia de purinas como única fuente de nitrógeno y en condición de carencia; ii) *phZ* se induce en presencia de adenina, hipoxantina y xantina aunque más levemente que *phU*, y el ácido úrico no parece tener un efecto inductor significativo; iii) el amonio parece no tener

efecto represor sobre *phZ* ni sobre *phU*, a diferencia de lo que se observa en *A. nidulans*. (Barraco Vega, 2010).

Hasta la fecha hay muy pocos reportes sobre los mecanismos y factores implicados en la regulación del metabolismo del nitrógeno en basidiomycotas, a diferencia de lo que sucede en ascomycotas y levaduras donde ha sido extensamente estudiada (ver sección 2.1 y 2.5). Se sabe que las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrato son reprimidas por amonio a nivel transcripcional en *Hebeloma cylindrosporium* (ectomicorriza) y *Ustilago maydis* (patógeno vegetal) (Lewis & Fincham, 1970; Banks *et al.*, 1993; Jargeat *et al.*, 2000, 2003). También han sido identificadas proteínas homólogas a AreA en *U. maydis*, y de Gat1 en el patógeno humano *Cryptococcus neoformans* además de un regulador de la actividad del factor GATA en este último (Kmetzsch *et al.*, 2011; Horst *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). En trabajos previos, mediante análisis *in silico* del genoma de *P. chrysosporium* identificamos dos posibles proteínas reguladoras con dominios homólogos a AreA (dedo de zinc del tipo C2C2) y dos con dominios homólogos a UaY (cluster binuclear de zinc C6Zn2). Asimismo, en las secuencias promotoras (400 – 480 upstream del ATG inicial) de los genes *phZ* y *phU*, identificamos motivos WGATAR que podrían ser sitios de unión de proteínas como AreA, y varias secuencias 5´- CGG-nX-CCG -3´, con los repetidos CGG invertidos, directos o divergentes y también secuencias WGCGG, todos posibles blanco de acción de proteínas de la familia de reguladores con cluster binuclear de zinc (Barraco Vega, 2010).



**Figura 2-14: Crecimiento en purinas de *P. chrysosporium* (A) y *P. atropurpurascens* (B).** Se muestra el crecimiento en el medio YCB en adenina (Ad), hipoxantina (Hx), Xantina (X), ácido úrico (AU), guanina (Gu) como fuentes de nitrógeno. Como control se incluye el crecimiento en amonio (NH<sub>4</sub>) y sin fuente de nitrógeno.

Conocer los mecanismos por los cuales los hongos degradadores de madera responden a las limitaciones de nitrógeno es crucial para comprender su fisiología. Los transportadores de purinas son importantes a la hora de proveer a los organismos de compuestos esenciales, también son determinantes de la sensibilidad de los mismos frente a citotóxicos y análogos mutagénicos. Esta tesis busca avanzar en este campo de estudio, caracterizando los primeros transportadores de purinas basidiomycotas.



## 3 Objetivos

---

### 3.1 Objetivo general

Caracterizar los transportadores de purinas de los basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens* así como contribuir a establecer los determinantes de la función de las proteínas de la familia *AzgA-like*.

### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar los transportadores de purinas de *P. chrysosporium*.
  - a) Estudiar la regulación transcripcional de los genes *phZ* y *phU*
  - b) Verificar la funcionalidad de ambos transportadores, estableciendo el perfil de sustratos transportados (purinas, derivados y análogos) y analizando su localización subcelular.
- 2) Analizar el transportador de purinas de *P. atropurpurascens*
  - a) Completar el clonado y estructura del gen *puZ*
  - b) Estudiar su regulación transcripcional.
- 3) Contribuir a la caracterización de la familia de transportadores de purinas *AzgA-like*.
  - a) Identificar *in silico* residuos y motivos característicos.
  - b) Generar mutantes que permitan avanzar en el conocimiento de los residuos/motivos determinantes de la función.

## 4 Resultados

---

### 4.1 Caracterización de los transportadores de *Phanerochaete chrysosporium*

#### 4.1.1 Clonado de secuencias codificantes de los transportadores PhZ y PhU

Para determinar la estructura de los genes *phZ* y *phU* de *P. chrysosporium* (verificación de secuencias codificantes e intrones), ambos fueron clonados a partir de ADN genómico y de ADN copia (ADNc). Se utilizaron *primers* específicos que permiten obtener la secuencia codificante completa desde el ATG inicial hasta el codón *stop* (PhZ-cF1, PhZ-cR1 y PhU-cF2 y PhU-cR2 (Tabla 7-3). Los ADNc se sintetizaron a partir de ARNm producidos en condiciones de inducción (medio mínimo, químicamente definido con hipoxantina (*phZ*) o ácido úrico (*phU*) como única fuente de nitrógeno (ver sección 2.9). Los amplicones se clonaron en el vector pGemTeasy (Promega). A partir de la comparación de secuencia de 4 clones de *phZ* y 3 de *phU* con las obtenidas de la base de datos (<http://genome.jgi-psf.org>): i) se verificó la presencia de 10 intrones en *phZ* y 4 en *phU*, tal como habían sido predichos teóricamente mediante el alineamiento de secuencias de proteínas homólogas y motivos pie de intrón; ii) se verificó el codón de iniciación y el de terminación; iii) se determinaron 5 diferencias en los 1737 pb de secuencia codificante de *phZ* (G1037A, G1139A, T1791C, A1794G, A1953C) con respecto a la secuencia de la base de datos (scaffold\_10:183102-185539) y 5 diferencias en los 1785 pb de *phU* (T60C, C1082T, G1083A, G1305A, C1627A) (scaffold\_22:347068-349063). Estas diferencias se mantienen en todos los clones secuenciados. Estos cambios no afectan la secuencia proteica a excepción de G1037A que cambia el aminoácido de glicina a glutamato (G156E) en PhZ y C1082T y G1083A que producen el cambio de alanina a valina (A328V) en la proteína PhU (Figura 4-1 y Figura 4-2).

De la misma forma se amplificó y clonó el gen *azgA* de *A. nidulans*, para ser utilizado como control a lo largo del trabajo. Se verificó que la secuencia clonada fuera idéntica a ANID\_08534.1 depositada en la base de datos del Broad Institute.

La comparación de las secuencias genómicas y de ADN copia, permitió verificar la estructura predicha de los genes. La funcionalidad de las proteínas se analizó utilizando los ADNc (ver sección 4.1.4).

```

-61 cgcaactcgtgtgacaaaactcatcgtccctctttctctctgacgaccaccacatccccgcgATGCCTATCGCCCTCACGCATAGGATCAA
                                     M P I A L T H R I N
30 CGCCTTCgtgcggtcccccgccgtccctcgcgaccactgctcgtgctgactgctcgtgacacagTGC GCGGACTCGCCGATAGGGCGC
  A F V A D S P V G R
120 TGGTTCACCTCGAGGGCTCTGGACACCCCAAGGAGCGCGTCCGCTCCCGCTTCTCgtgcggtcgccgctcctgttctctgcccgcggctc
  W F H L E G S G H P K E R V G S R F L
210 ctgacttccccgcgaccctgacAGCGAGCTCCGTGCAGGGCTCACAACTGGgtgcggtcgtgttctcccacgcgcgctcgtcgcgatget
  T E L R A G L T T W
300 gaccctcctccagGCCGCCATGGCTACATCgtgcggtttcgcctccccgcctcccccttgcagctgctgacgcgcgcagATCTC
  A A M A Y I I S
390 GGTGAACGCCTCCATCATCTCGGACACGGGCGGAACCTGCGTCTGCACGCAGCCGACCTGTGCGTGAACGATGAGACATATCTGTCTGTG
  V N A S I I S D T G G T C V C T Q P D L C V N D E T Y L S C
480 CGTCGCCGACGTCGCCCGGACCTCATCACGAGTACCGCCCGCTCTCCGCGCTCGCGTCTCCTCATGGCCCTCCTCGCAACCTCCC
  V A D V R R D L I T S T A A V S A L A S F L M G L L A N L P
570 AGTCGGCATGGCGCCGGACTCGGGTTGAACGCATACgtgagtcgtctgctcgcgtcatgccccctctggcgctgctgttctctgcggtg
  V G M A P G L G L N A Y
660 ctggcgcgcgggcccgctgttgcctttgcttctcctcgcgattgcccctgcgcccgcacacagcgtgcccgcctgtgctaccg
750 ggcctggctatgcccgaacggcgctgcatgcccgtcgcgacagcggcaactccatgctatccgaggacacccatgtgtcctgctgatgcac
840 gccagataccctccccgcgatataaattttgcgctgacacttttgtgctctagTTCACATACTCGGTTGTGGgtatgtcaatatgctt
  F T Y S V V G
930 tgatgtgtatgcacagcgtccccctctgacggcacgtgaccccatccagTTTCCAGGGAGCGGCATCATCAGTACCCGAGGCTCTCGC
  F H G S G I I T Y R E A L A
1020 TCGGCTCTCTTGGAGgtgcggtttctgtcttcttctcgtgatgggtggcgcatcgtcctcttagGTGGTTCTTCTTCTCTCTC
  A V F L E E W F F F F L
1110 TCTCTTCTCGGCTCTCCGCAATGGCTTGCACGCATCATGCCGAGTCCGCTCGCATGGCCGTCGGTCTGGCATCGGCTTGTTCATTGCg
  S L L G L R Q W L A R I M P Q S L V M A V G A G I G L F I A
1200 tgagtaccactgtgccccctcgtcgcaggtgacctgttccacagATTCATCGGCTTGTgtacgtctctgccccgcctgattctg
  F I G L
1290 cgctgtaacagaactgacaggtttgttctatagCTGGAGGAGGCCTCGGCGTCATTGGCGGTGACACGACCAACCTCGTCGGTCTTGGTG
  S G G G L G V I G G D T T N L V G L G
1380 GATGCTGCCCAGTACTACACGTCGCCAGATCTGCCCAACTACTCGCGTCCGACGTCCTGCAGTCCGCAACAAATGTGGCTCGGCATCT
  G C L P Q Y Y T S P D L P N Y C A S H V L Q S P T M W G I
1470 TCGTCGGCGGCTCTTACAGGTGTTCTGATGCTTTACCGTGTCAAGGGCGGATCCTGATCGGCATCTTCTGACGAGCATCATAGCT
  F V G G V F T V F L M L Y R V K G A I L I G I F L T S I I S
1560 GGCCGCGCCGACGTCGGTGACGTACTTCCCGCACACGGACACGGGCGACAGGCCTTCGACTTCTTCAAGCAGGTCTGCACCTTCCGTC
  W P R P T S V T Y F P H T D T G D Q A F D F F K Q V V T F R
1650 CGCTCAAGCGCATCGGCAACGCGCTCGACTACAACACTACAGCAACGGCCGCTGTGGTACGCGTTGATCACGTTCTGTACGTCGACATCC
  P L K R I G N A L D Y N Y S N G R V W Y A L I T F L Y V D I
1740 TCGACACGACTGGAACGCTGTACTCGATGGCCAAGTTCGCGGGCTGCGCAACCGGTGACGCTCGACTTTGAGAAGTTCGACGATCGCGT
  L D T T G T L Y S M A K F A G L R D P V T L D F E N S T I A
1830 ACTGCGTTGACGCGTTCAGCATCAGCATGGGCGCGCTCATGGGCACTCCCGTGTACCAGCGTTCATCGAGTCCGCGACCGGTATCTCCG
  Y C V D A F S I S M G A L M G T S P V T A F I E S A T G I S
1920 AGGGTGGCAAGACGGCCCTACCGCATCACGACGGCTTCGCGTTCCTCATCAGCGTGTCTTCGCCCCGATCTTTGCGAGCATCCCCT
  E G G K T G L T A I T T G F A F F I S V F F A P I F A S I P
2010 CCTGGGTACAGGCGGTGCCCTCGTCATCGTTGGCTCGTGTATGATCCGCAACGTCGCGTATATCAACTGGGACTATGTCGGCGACTCTG
  S W A T G G A L V I V G S L M I R N V R D I N W D Y V G D S
2100 gtgcggtccttctttccccgcgctcgtgacgcagctgacctcgcgtccgagTGCCCGCTTCTCAGGCTCATCATATCCCCG
  V P A F L T L I I I P
2190 TGACGTACAACATCGCGTACGGCGTCATCGCGGCATCATCTCGTTCGTGCTCATCAACGGGCTCGCGTGGGCGTGCACAAGGTGTCCG
  L T Y N I A Y G V I A G I I S F V L I N G L A W A L R K V S
2280 GCGAGCGCTTCGCGCCGCGAAGTACGACGCGAGCGAGCCGTGGGTTCATCCCGCGGGGAGCATCGTCCCGCGTGGATGCGCTTCATCG
  G E R F A P P N Y D A S E P W V I P P G S I V P A W M R F I
2370 CGGGCCGACCGGGCTCGCGCGGACCGCCCGCAACGTCCTGCGGACGCGGACGTCGTCGAGATGGAGCAGCATGCCACGACGCCG
  A G R T G L A R D A A R E R P A D A D V L E M E Q H A H D A
2460 CGAGCGGAGCTCGCTTGGCAACACGTCGCCGCTGTGCGGAGCCGTCACCGAGAAGGACGACTGAgcggtggatgtgggaggggtggg
  A S A S S L G K H V P A V A E P V T E K D D *
2550 tgggttaagaataatgatgatacagcgttttggctcctcgcgctcgtgcgcaeggcctcgttgcagggcgccccggga
2640 cctgctcggcgctggcgggcaccgtttgcagaggagaaaatccaaaaacacaaacagaaatcattgttgcgtcgtcgtctctc

```

Figura 4-1: Gen *phz* y proteína PhZ de *P. chrysosporium*. El codón de iniciación y terminación y los motivos pie de intrón se indican con subrayado. Las secuencias de los primers para amplificación se indican con flechas. Los cambios con respecto a la secuencia scaffold\_10:183102-185539 de la base de datos (<http://genome.jgi-psf.org>) se indican en sombreado.

```

-40 accagcccaactccgccttcgctggaccgcttcgctcgcgcccaATGTCTGACCACTCGATTGTGAAGACCAGCCTGGTCGCGTGCCTCCCC
      M S D H S I V K D Q P G R V P S P
51 GACTGTGCAGCCCGTGGGCCCCACGAGCGCAGTCCGCCCGGCTCGGCCGCCCTTGCGCACAAAGTTGCGACGCGGAGGGCTGGCTTGG
      T V H A V G P T S A V R R R L G R L A H K F A T R E G W L G
141 GGACTACAACATATGCGTGGCTCTGTACGCCGACGCTGCCCTTTGCGCTCGGTGGTTCGACGGCGCAAGACGATGCCGCCATTCTATGCACT
      D Y N Y A W L C T P T L P F A L G G R R R K T M P P F Y A L
231 CGACTCCGACCTCCCCTCTGCTTGGCTCGCGTGGGGCTCCAGCATGCGCTTGCATGCTTGCGGGGCTTATCACGCCCCGATCAT
      D S D L P L L L A L A C G L Q H A L A M L A G L I T P P I I
321 CTTTGCAGTGCACCTCAGCCTCGATGCGGAGACGCTCTGCGTATATGATCTCGGCCCTCCCTCATTGGATGTGgtgagatgaatggcttca
      F A S A L S L D A E T S A Y M I S A S L I G C
411 tgtgaataactgtccgcttcatacctttgcagGTATTCTTAGTGGTGCAGATGCCAGGATACACCTGTTCAAGAACTACTATCTTGGC
      G I L S L V Q M S R I H L F K N Y Y L G
501 ACCGGCCTGATCAGCGTGGTGGGACCAGCCTTTGCGACCTGAGTACGGCGAACCGGgtacgtccctccacagtcgctgccttcccgcgc
      T G L I S V V G T S F A T L S T A N A
591 tctaaactcgcatgtagATATTTGATGCGATGTACGCCGACGGTACATGCCCTTCGACCACCGCGCAGATGGCACTGTCACTCGCGGACC
      I F D A M Y A D G T C P S T T A A D G T V T R G P
681 ATGTCCGGACGCTTACGGCATGGTGTGGGAACGTCATCATCTGCTCGTTCCTCGAAATTTTCATGTCCTTCGTCGCCCGCGTATTCT
      C P D A Y G M V L G T S I I C S F L E I F M S F V P P R I L
771 CCAGAGGATATCCCAGCGATGGTCACTGGCACTGTCATCCTTATGATCGGAGCGTCGCTTGTGGCTCGTGGGGATCCCGACTGGGG
      Q R I F P P M V T G T V I L M I G A S L V G S S G I P D W G
861 TGGCGGCTCGAACACTGCATGAGCAGGCCTGCGTCCGGATTCTTCGCGCTATGTCGGACGCTCTCTGCGCCGCGCCACTGCCGTGGGG
      G G S N D C M S R P A S G F F A L C P D V S A P R P L P W G
951 CTCGCCAGAGTTTCATCGGCCCTTGGCTTCTCTCTCGTGTCCATCATCATCACGGAGCTCTTCGGCTCGCCGTTCTCTCAAGAACATATC
      S P E F I G L G F L S F V S I I I T E L F G S P F L K N I S
1041 CATCATCGTCCGCCCTCGCCGTCGGCTGCATCGTCGAGCGGTAGCGGGCTACATTGACGGAAGCACGATCTCGAGCGCCCGCGCATCAC
      I I V G L A V G C I V A G V A G Y I D G S T I S S A P A I T
1131 ATTCTGTGGTGCACCGCTTCAAGCTCCGCTGCTACGCACGCAATCTTGCCTATGTTTGGCGGTACGTTGCTTGGCTATGGAGGC
      F L W V H R F K L R V Y A P A I L P M F A V Y V S L A M E A
1221 GATTGGCGACATCACTGCGTCCCGGAGGTCTCGCGCGTGCCCGTTCGACGCGAAGAGTTCGACTCGCGCATCCAGGGTGGCGTACTCAG
      I G D I T A S A E V S R V P V D G E E F D S R I Q G G V L S
1311 CGACGGCATCGCGGTTTCTCTCCGCACTTTTACCCTGACGCCGCTGTCGATCTTTGCGCAGAATAACGGTGTATCGCCATCACGCG
      D G I G G F L S A L F T V T P L S I F A Q N N G V I A I T R
1401 CTGCGGAACCGCACTGCGGGCCGCTTCTGCTGCATGTTCTCTCATCTCTTTGGCGTGTGGCAAGATCTCGGGTGTCTCTCCGCGAg
      C A N R T A G R F C C M F L I L F G V L G K I S G V F L A
1491 tacgctgcgcttcaegctgccccgctgactgacactgacagcgccgctgtagTCCCGAATCCCCTCTGGTGGCGTGACCACGTTCTCTGT
      I P N P V L G G V T T F L
1581 TCGCGTGGTGGCGGTTTCTGGCATTGCGGTGCTCTCGTATTGCCGATTTACACGGCGAGATCGCTTTGTGCTTGGCGCGCTCTGTGCT
      F A S V A V S G I R V L S Y C R F T R R D R F V L A A A L S
1671 TCGGTATCGGTGACCTCCTTGTGCCGACCATCTTTACGCACCTCTTCGATGGCGTTAAGCATCCAACAAGGCCCTGCAGGGCTTCTTCG
      F G I G D L L V P T I F T H L F D G V K H P N K G L Q G F F
1761 ACTCTATAACGATTGTTCTTAGCACACCCTgtaagtggtacttgacaacctcggtgtacttcatggcgcgctgacttccgcgcgctgcag
      D S I T I V L S T P
1851 TTCTGGTTCGCTGGCATTGTGGCCCGGTGCTAAACCAAATACTGCCTCAAGAAGATAAAGAAGAAGAGGATGAAGAGACAGGGGTGGAAG
      F L V A G I V A A V L N Q I L P Q E D K E E E D E E T G V E
1941 TCATTGATGTCGAGGCCCATCACAGTCCGCTTGAGAAAGAGAAGGACAGGGATTGAgcttcatgtacatattattagtggaatattcag
      V I D V E A H H S P L E K E K D R D
2031 atggttgtgatcttcaactctggcagatagtgctgtaaacaccacagcttacctgctaggacaataagtaacggataagaactagta
3121 gtaagccagttgatgaagtccccggaagcgcttccccctcgcgccgggacgacactagcggaggcggtccacac

```

Figura 4-2: Gen *phU* y proteína PhU de *P. chrysosporium*. El codón de iniciación y terminación y los motivos pie de intrón se indican con subrayado. Las secuencias de los primers para amplificación se indican con flechas. Los cambios con respecto a la secuencia scaffold\_22:347068-349063 de la base de datos (<http://genome.jgi-psf.org>) se indican en sombreado.

#### 4.1.2 Análisis de la estructura secundaria de las proteínas transportadoras PhU y PhZ

La estructura de las proteínas PhU y PhZ se estudió utilizando los programas *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *ClustalW* ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)) y el predictor de estructuras secundarias TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Si bien el alcance de este tipo de programas (SOSUI, TMHMM, etc) es limitado y muchas veces las estructuras predichas presentan diferencias con los modelos tridimensionales construidos en base a proteínas cristalizadas, son herramientas rápidas, fácilmente disponibles y de gran valor cuando existen menos datos experimentales. En este trabajo se utilizaron para comparar la estructura de PhU y PhZ con las de sus homólogas de función conocida.

La secuencia PhU (593 aa) presenta alta similaridad e identidad con UapA (69% y 50% respectivamente, e value 0,0, cobertura 92%) y con el resto de las proteínas NAT de función conocida. Presenta los residuos altamente conservados en las proteínas de esta familia destacándose (Figura 4-3): los 13 residuos invariantes y el motivo característico “*NAT signature motif*”, Q<sup>425</sup>-N<sup>426</sup>-N<sup>427</sup>-G<sup>428</sup>-X<sup>4</sup>-T<sup>433</sup>-R<sup>434</sup>, que es idéntico al de UapA. Según los predictores antes mencionados, PhU y UapA tendrían 12 STMs y dos dominios citoplasmáticos, uno amino y otro carboxilo terminal. Estos programas predicen la misma estructura para los transportadores UapC, XanQ, YgfU y PucJ, mientras que para UraA, Lpe1, XanP y RutG la cantidad de STM predichos es 11 y para SNBT1, SVCT1, SVCT2 y PyrP es 10.

Considerando la alta similitud de PhU y UapA entre sus secuencias y sus estructuras secundarias predichas, y que la similitud de secuencias de estas dos proteínas respecto a UraA es alta (26-23% identidad, 44-40%, similitud,  $5 \times 10^{-20}$ - $1 \times 10^{-17}$  e value y 69-82% cobertura para PhU-UapA respectivamente), es posible suponer que el transportador de *P. chrysosporium* se ajuste al modelo tridimensional de UapA (construido en base al cristal de UraA). Según este modelo, estas proteínas tendrían 14 STMs. Los 23 residuos identificados como críticos para la funcionalidad y especificidad de UapA se ubican en los STMs 1, 3, 8, 10, 12, 13 y 1 (ver sección 2.7). Entre estos residuos, solo cinco no se conservan en PhU: Q113/120A (loop STM 1-2), M151/157V (STM3), A441/457S (loop STM11-12), A469/486R (STM12) y G527/546P (STM14), sin embargo todos estos cambios están presentes en alguna otra de las proteínas NAT de función verificada (numeración respecto a UapA/PhU, ver Figura 4-3).

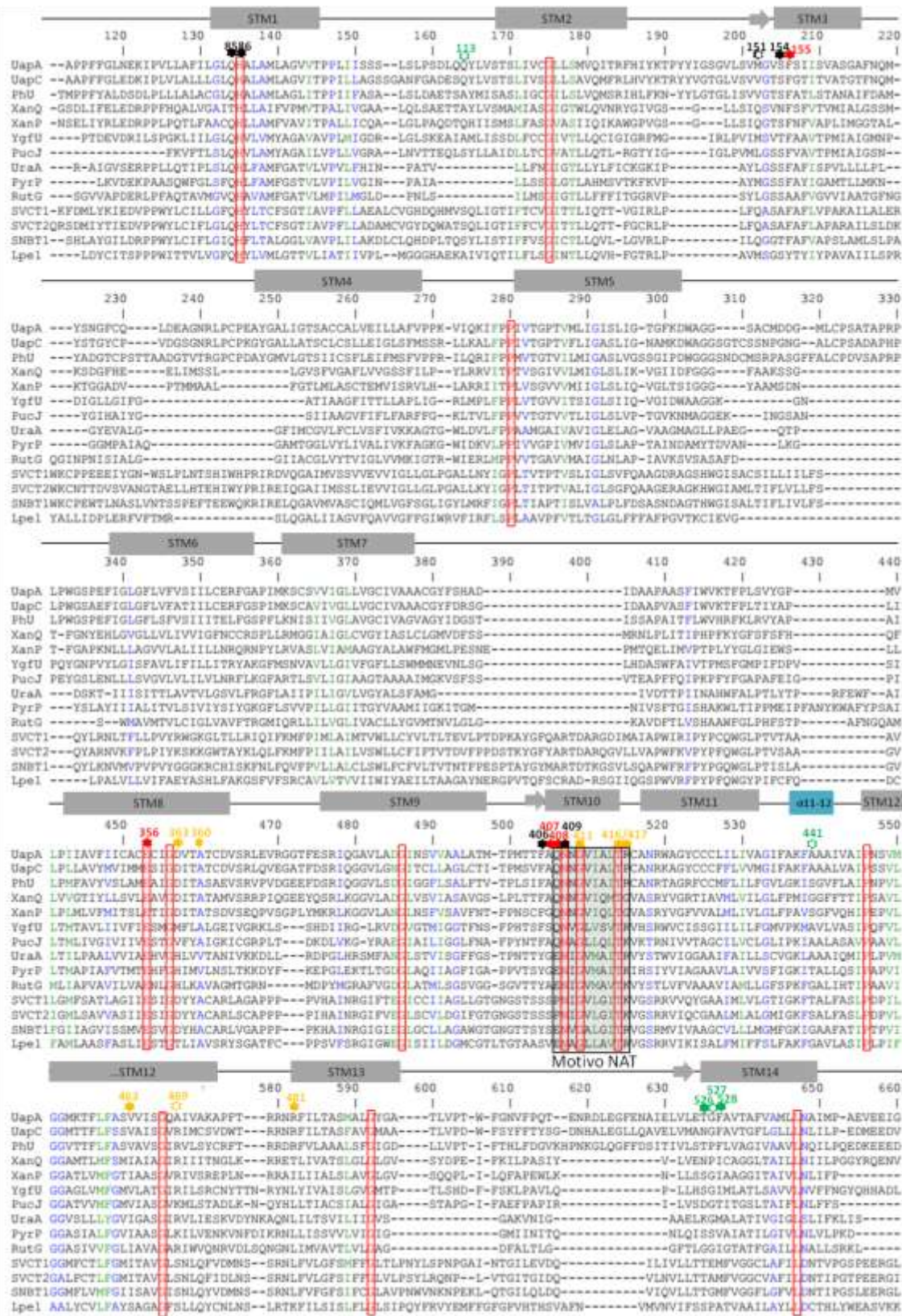
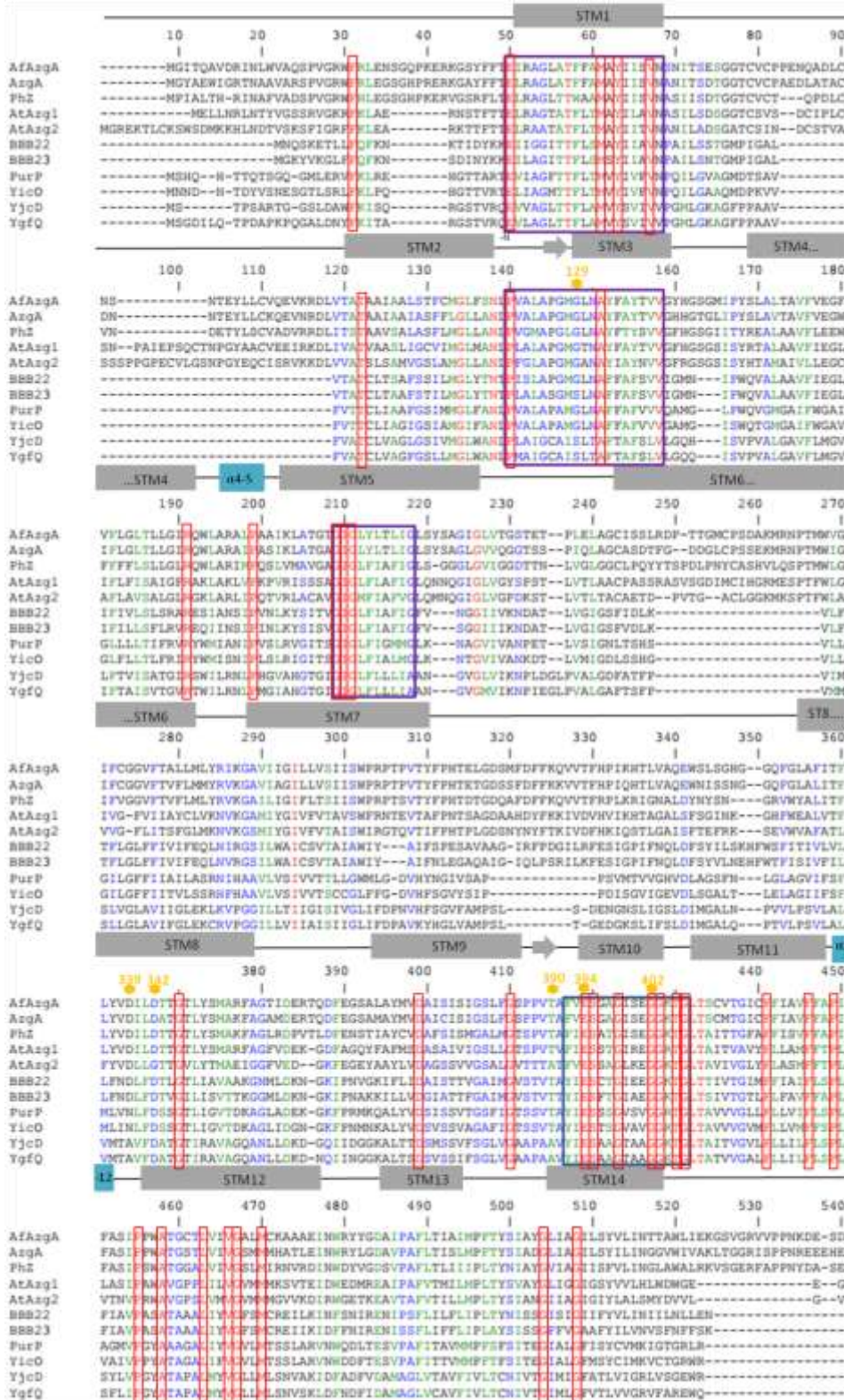


Figura 4-3: Análisis de PhU, y homólogos NAT de función conocida. Sigue en página 42.

(Continuación **Figura 4-3**, página 41) Alineamiento mediante ClustalW de PhU; UapA y UapC de *A. nidulans*; Lpe1 de *Zea mays*; SNBT1 de *Rattus norvegicus*; SVCT1 y SVCT2 de *Homo sapiens*; XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG de *E. coli*; PucJ de *Bacillus subtilis* y PyrP de *Lactococcus lactis*. Se omitieron regiones 1-100 y 661-740 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Sobre el alineamiento se esquematiza la estructura secundaria predicha para UapA según el modelo tridimensional: los segmentos transmembrana (STM) se representan mediante rectángulos grises, los que forman hojas  $\beta$  mediante flechas y la hélice interna mediante rectángulo azul. Los residuos invariantes se muestran recuadrados en rojo. El motivo NAT (Q/E/P)-N-X-G-X4-T-(R/K/G) se muestra recuadrado en negro y sombreado en gris. Los aminoácidos críticos para la función y especificidad de UapA se marcan con estrellas de color y los que son diferentes en PhU con estrellas de color y centro blanco: rojo los implicados en el sitio de unión al sustrato, naranja los implicados en la vía de translocación, verde los que amplían la especificidad y negros los implicados en la interacción de los segmentos transmembrana (Kosti *et al.*, 2012). La numeración de los aminoácidos marcados se corresponde con la secuencia de UapA.

PhZ (578 aa) presenta alta similaridad con AzgA (58% identidad, 72% de similitud, E value 0.0, 98% cobertura). Según los predictores ambas proteínas tendrían 8 TMS con dos dominios citoplasmáticos uno amino y uno carboxilo terminal. Entre las proteínas *AzgA-like* de función conocida, PhZ es la que tendría mayor similitud estructural con la de *A. nidulans*. Para *AfAzgA*, *AtAzg1* y *AtAzg2* se predice una estructura con 10 STM y para los transportadores bacterianos el número de STM predichos es aún mayor (PurP, YicO, YjcD: 13 STM y YgfQ, BBB22, BBB23: 12 STM). Sin embargo, el modelo de la estructura tridimensional de AzgA recientemente publicado, sugiere la presencia de 14 STMs (Kryptou *et al.*, 2014). La alta similitud entre PhZ-AzgA, justifica suponer que su estructura es muy similar y por lo tanto que PhZ se ajustaría al mismo modelo. Los valores de similitud de estas dos secuencias con la proteína cristalizada UraA son: 33-27% identidad, 61-44%, similitud, 0.42-1.2 E value y 28-15% cobertura para PhZ-AzgA respectivamente. Los seis residuos que en AzgA han sido identificados como críticos para la función se conservan en PhZ: G125/129 en STM3, D334/339 y D337/342 en STM8, T385/390, E389/394 y G397/402 en STM10 (numeración PhZ/ AzgA) (Figura 4-4).

El alineamiento de las secuencias PhZ y demás proteínas *AzgA-like* de función conocida muestra la presencia de cuatro motivos conservados y 34 residuos invariantes (Figura 4-4). Tanto los motivos como los residuos invariantes se mantienen al incorporar al análisis 144 secuencias correspondientes a proteínas hipotéticas deducidas de genomas secuenciados (29 de procariontes, 35 de plantas, 54 de hongos ascomycotas y 26 de basidiomycotas). Estos motivos no están presentes en proteínas de otras familias de transportadores, y parecen ser característicos de esta familia, por lo que el análisis de mutantes en sus residuos promete contribuir en el establecimiento de las relaciones estructura-función de la familia *AzgA-like* (Ver sección 4.3).



**Figura 4-4: Análisis de PhZ, y homólogos AzgA-like función conocida.** Alineamiento mediante ClustalW de PhZ; AzgA de *A. nidulans*; AfAagA de *A. fumigatus*; AtAag1 y AtAag2 de *A. thaliana*; BBB22 y BBB23 de *B. burgdorferi*; y PurP, YicO, YjcD y YgfQ de *E. coli*. Se omitió región 541-610 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Sobre el alineamiento se esquematiza la estructura secundaria predicha para AzgA según el modelo tridimensional: Los STM se representan mediante rectángulos grises, las hojas  $\beta$  mediante flechas y las hélices internas mediante rectángulo azul. Los aminoácidos críticos para la función de AzgA se marcan con estrellas naranjas (Kryptou *et al.*, 2014). La numeración de los aminoácidos marcados se corresponde con la secuencia de AzgA. Los recuadros indican los motivos conservados (ver sección 4.3). Los residuos invariantes en todas las AzgA-like analizadas (incluidas las 144 proteínas hipotéticas) se muestran recuadrados en rojo.



### 4.1.3 Estudios de expresión génica de *phZ* y *phU*

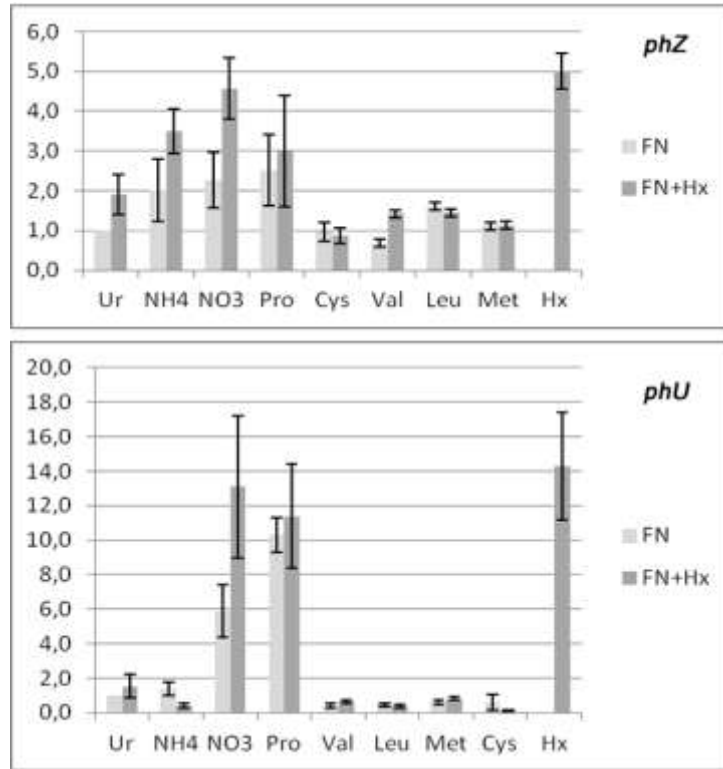
Previo a esta tesis estudiamos la expresión génica de los transportadores de purinas de *P. chrysosporium*. Determinamos que *phU* se induce en presencia de purinas y en ausencia de nitrógeno, y *phZ* se induce en presencia de adenina, hipoxantina y xantina aunque más levemente que *phU*; y el ácido úrico no parecía tener un efecto inductor significativo. El amonio a diferencia de lo que ocurre en *A.nidulans* no mostraba efecto represor sobre *phZ* ni sobre *phU* (Barraco Vega, 2010).

En esa instancia se consideró como nivel basal, la expresión de ambos genes en urea como fuente de nitrógeno, por analogía con *A. nidulans*. Sin embargo, la urea puede ser una condición de represión y en todo caso hay que demostrarlo, más en un organismo del que poco o nada se conoce, por lo que nos planteamos determinar el nivel basal de expresión de ambos genes.

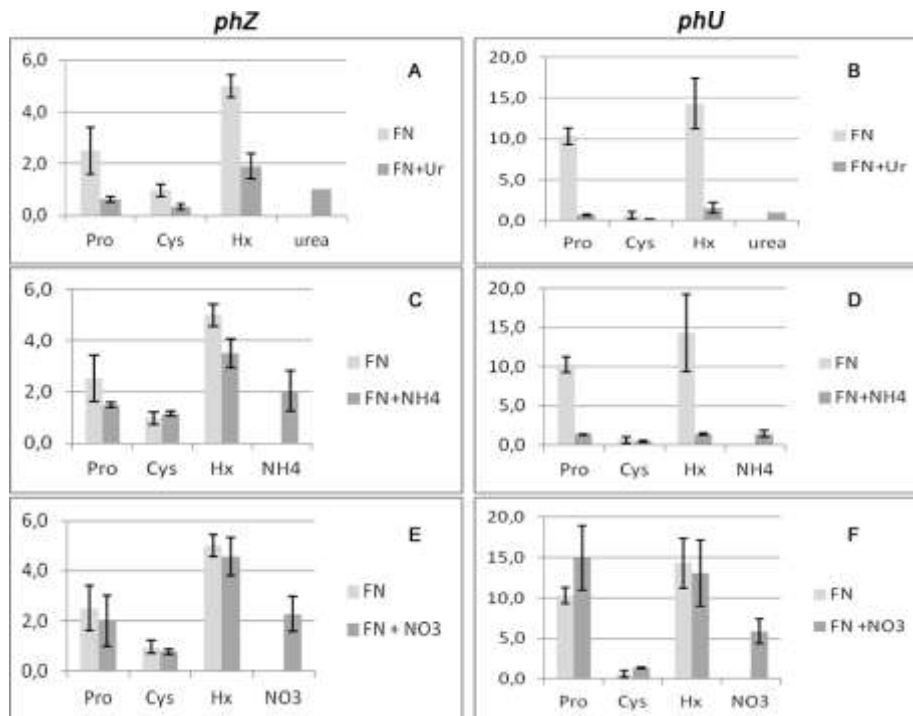
Para determinar la acción de la urea sobre la expresión de *phZ* y *phU* se comparó el nivel de ARNm obtenido en hipoxantina (condición inductora) con el obtenido en hipoxantina más urea. La acumulación de ARNm se midió mediante qRT-PCR en dos ensayos independientes utilizando como referencia el gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gpd*) y urea como condición calibrador según el procedimiento descrito en Barraco Vega, 2010. Determinamos que la urea es una condición de represión de ambos genes, ya que el agregado de la misma disminuye la expresión que se obtiene en presencia de hipoxantina (Figura 4-5).

En busca de una condición que no induzca ni reprima la expresión de *phZ* y *phU*, analizamos la cantidad de ARNm acumulado en presencia de fuentes de nitrógeno no relacionadas con la vía catabólica de las purinas como nitrato y aminoácidos (valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina, arginina y prolina). En todos los casos se comparó el nivel acumulado en la condición inductora hipoxantina con el obtenido cuando además de hipoxantina alguno de estos metabolitos está presente en el medio.

Al igual que la urea, el amonio y los aminoácidos analizados (excepto prolina) tienen efecto represor en ambos genes (Figura 4-5 y Figura 4-6 A-D). Entre las fuentes de nitrógeno analizadas, el nitrato es la única no represora de la expresión de ambos genes ya que el agregado del mismo no disminuye los niveles de ARNm acumulado respecto al de hipoxantina (Figura 4-5). Además el agregado de nitrato a otras fuentes (prolina y cisteína) tampoco produce variaciones significativas (Figura 4-6 E y F). Por lo tanto, esta condición se consideró la correspondiente al nivel basal de expresión de estos genes.

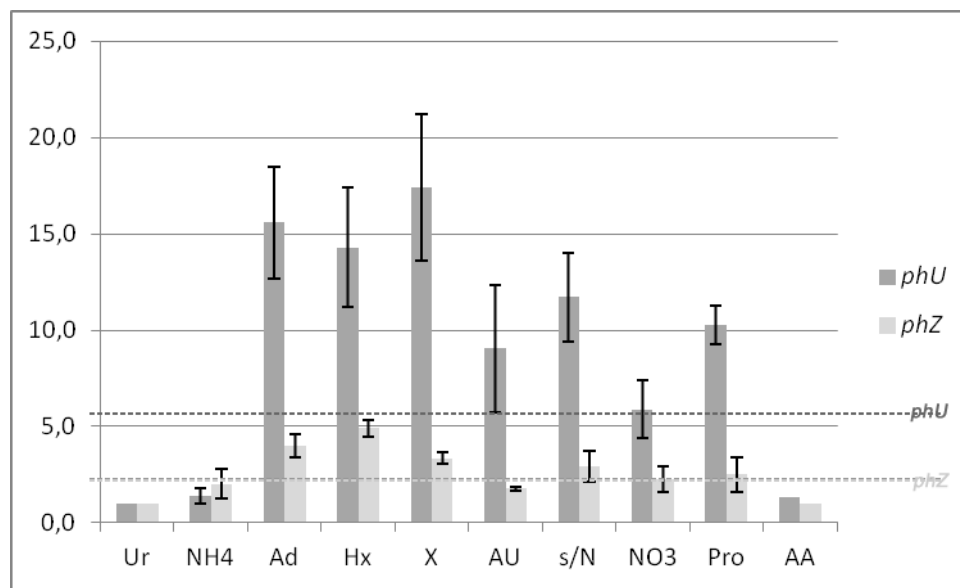


**Figura 4-5: Determinación de condición no inductora-no represora para *phZ* y *phU*:** Medidas de acumulación de ARNm de *phZ* y *phU*. Gráfica del coeficiente R en distintas condiciones: amonio (NH4), urea (Ur), nitrato (NO3), prolina (Pro), valina (Val), leucina (Leu), metionina (Met), cisteína (Cys), e hipoxantina (Hx) se muestran en gris claro; en gris oscuro se muestran los R cuando la condición es hipoxantina.



**Figura 4-6: Evaluación de nitrato como condición no inductora-no represora de *phZ* y *phU*.** Medidas de acumulación de ARNm de *phZ* (A, C y E) y *phU* (B, D y F). Gráficas del coeficiente R en distintas condiciones: prolina (Pro), cisteína (Cys), hipoxantina (Hx), urea (Ur), amonio (NH4) y nitrato (NO3), se muestran en gris claro; en gris oscuro se muestran los R cuando a las fuentes de nitrógeno (FN): prolina, cisteína, e hipoxantina se les adiciona urea (A y B), amonio (C y D) y nitrato (E y F).

Los resultados indican que: el nivel basal de expresión de *phU* es más alto que *phZ*. *phU* es inducido por las cuatro purinas, carencia de nitrógeno y prolina, y reprimido por la presencia de amonio, urea y aminoácidos (valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina y arginina). *phZ* es inducido claramente por sus sustratos hipoxantina y adenina y menos por xantina (ver sección 4.1.5), y claramente reprimido por urea y aminoácidos. En condiciones de carencia de nitrógeno, o en presencia de prolina, este gen se expresa prácticamente a nivel basal, levemente por encima; y en presencia de amonio y ácido úrico levemente por debajo (Figura 4-7).



**Figura 4-7: Acumulación de ARNm de *phZ* y *phU*.** Gráfica del coeficiente R en distintas condiciones: urea (Ur), amonio (NH<sub>4</sub>), adenina (Ad), xantina (X), hipoxantina (Hx), sin nitrógeno (s/N), , nitrato (NO<sub>3</sub>), prolina (Pro) y los aminoácidos: valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina y arginina (para los cuales se muestra el R promedio representado como AA). En línea punteada se marca el nivel de basal de expresión de *phZ* (gris claro) y *phU* (gris oscuro).

#### 4.1.4 Construcción de *A.nidulans::phZ* y *::phU*

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad de los transportadores de *P. chrysosporium* elegimos expresarlos en *A. nidulans* ya que además de ser un hongo filamentoso ampliamente utilizado como modelo de investigación y poseer características que favorecen la expresión de secuencias heterólogas, es el organismo donde se ha estudiado en mayor detalle tanto el catabolismo como el sistema de captación de purinas (ver sección 2.8). Se construyeron cepas de *A. nidulans*, cada una conteniendo un único gen transportador y ubicado en el sitio cromosómico de *azgA*, de forma que estas cepas expresan los transportadores PhZ y PhU en el contexto genético de la permeasa de *A. nidulans* (AzgA). Para lo cual, la cepa *A.nidulans* receptora carece de los genes propios (*azgA*, *upaA* y *uapC*) (sección 4.1.4.2) y, el ADN a incorporar se fusionó a secuencias cromosómicas del lugar a donde se quiere dirigir la integración (sección 4.1.4.1). Cuando se analiza la actividad de

un transportador por expresión en un organismo diferente al de origen, los fenotipos obtenidos pueden atribuirse a factores propios de la proteína (baja capacidad de transporte o afinidad por el sustrato) o a una ineficiente resolución de los intrones por la cepa receptora. Con el fin de eliminar esta última variable la funcionalidad de las proteínas se analizó utilizando el ADN copia de *P. chrysosporium*.

#### **4.1.4.1 Subclonado: fusión a promotor y terminador de *A. nidulans***

Para favorecer la integración de cada uno de los genes en estudio en la ubicación del gen *azgA* en *A. nidulans*, se construyeron los *cassettes* 5'*azgA*-transportador-*gfp-riboB*-3'*azgA* y 5'*azgA*-transportador-*riboB*-3'*azgA*, para las secuencias codificantes de *phZ* y *phU* de *P. chrysosporium* y el propio gen *azgA* de *A. nidulans* (control). Según se detalla a continuación (ver esquema en Figura 4-8).

##### a) Construcción de los componentes del sistema para generación de *cassettes*.

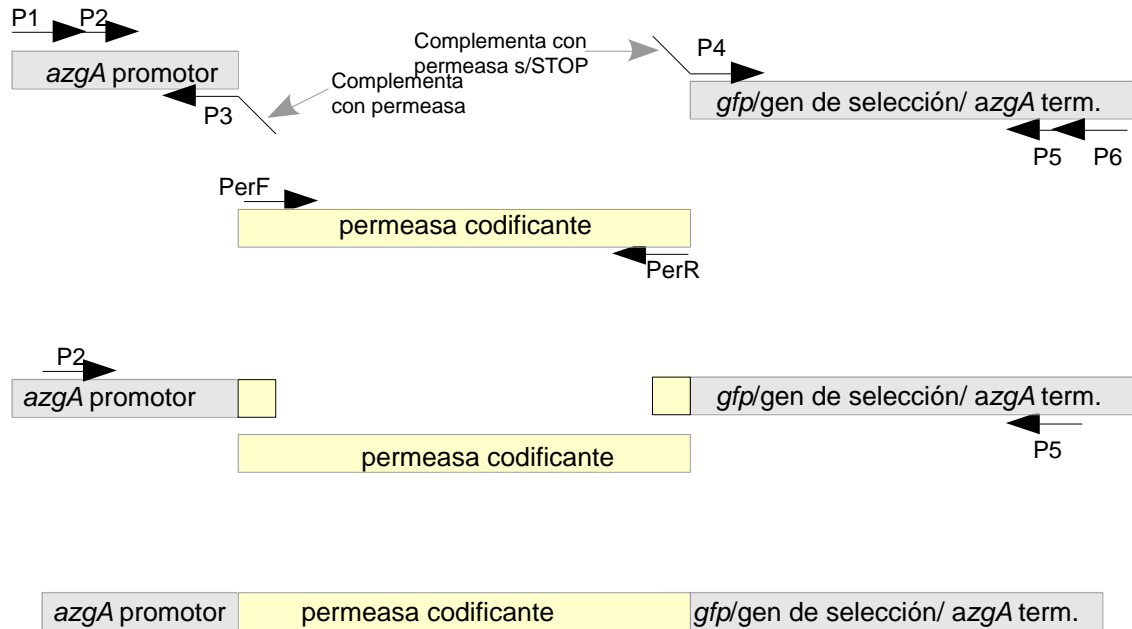
i) La región 5' del gen *azgA* hasta el codón de iniciación (850 pb), se amplificó a partir de ADN genómico con *primers* específicos (FP1AN5ZF1 y AN5ZR1) y se clonó en pGemT-easy (Promega): plásmido p5'*azgA*.

ii) El plásmido p3'*azgA* que contiene las secuencias *gfp-riboB*-3'*azgA* se construyó mediante la inserción de un fragmento de la región 3'*azgA* en el plásmido pHL82. Este plásmido pHL82 posee la secuencia del gen *gfp* (*green fluorescent protein*) seguida del gen de selección *riboB* (complementación de la auxotrofia de riboflavina). La secuencia 3'*azgA*, 950 pb desde el codón de finalización, se amplificó a partir de ADN genómico con *primers* específicos (AN3ZF y FP6AN3ZR1) y posteriormente se insertó en pHL82 por la técnica de RF-PCR (*restriction free PCR*).

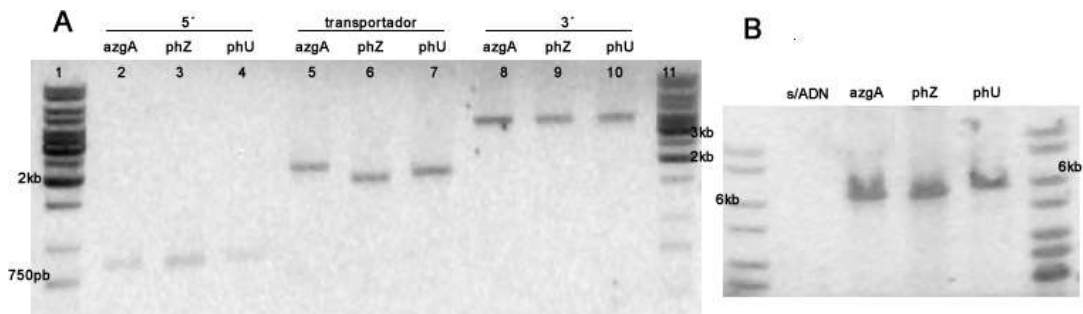
##### b) Construcción de *cassettes* 5'*azgA*-transportador-*gfp-riboB*-3'*azgA*

Los dos componentes antes descritos (5'*azgA* y *gfp-riboB*-3'*azgA*), se unieron a las secuencias codificantes de *phZ* y *phU* según Figura 4-8. i) Se amplificó la secuencia codificante de cada transportador previamente clonados (sección 4.1.1); ii) la región 5'*azgA* se amplificó usando un *primer* reverso que además de 20 nucleótidos específicos de la secuencia contiene los primeros 20 nucleótidos del correspondiente gen transportador; iii) se amplificó la secuencia *gfp-riboB*-3'*azgA* usando un *primer forward* que incluye 20 nucleótidos adicionales que complementan con el final de transportador sin incluir el codón de terminación. De esta forma se generaron amplicones 5' y 3' que solapan en 20 nucleótidos a cada gen transportador a unirse y por tanto los tres fragmentos actúan tanto de ADN molde como de *primers* en una PCR. El paso final, es la amplificación con

*primers* desde los bordes, obteniéndose como resultado una única molécula integrada: 5'*azgA*-transportador-*gfp-riboB*-3'*azgA* ( $\approx 6750\text{pb}$ ). Este procedimiento se realizó para cada transportador, en el caso de *azgA* en lugar de ADNc se utilizó ADNg (Figura 4-9). Todos los clones y construcciones fueron verificados por secuencia.



**Figura 4-8:** Esquema de la construcción del *cassette* 5'*azgA*-transportador-*gfp-ribo*-3'*azgA* mediante la técnica de fusión por PCR. Los *primers* se nombran a modo ilustrativo ver Tabla 7-3)



**Figura 4-9:** Construcción de *cassettes* 5'*azgA*-transportador-*gfp-ribo*-3'*azgA*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con BrEt de los productos de PCR A) Componentes para la construcción: Carriles 2-4, amplificación de la región 5' del gen *azgA* con un extremos que solapa con *azgA*, *phZ* y *phU* respectivamente (850pb). Carriles 5-7, amplificación del gen *azgA* (2015pb), *phZ* (1737pb) y *phU* (1785pb) respectivamente. Carriles 8-9, amplificación de la región 3' del gen *azgA* con un extremos que solapa con *azgA*, *phZ* y *phU* respectivamente (3900pb). Carriles 1 y 11 marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific. B) Productos de fusión 5'*azgA*-gen transportador-*gfp-ribo*-3'*azgA* para *azgA*, *phZ* y *phU*, control de PCR sin ADN (s/ADN). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific.

c) Construcción de *cassettes* 5'*azgA*-transportador-*riboB*-3'*azgA*

Estos *cassettes* (sin *gfp*), se construyeron como los anteriores (sección b). La única diferencia consistió en que el *primer* directo (P4 en Figura 4-8) utilizado para la amplificación de la región 3', complementa con el gen *riboB* (en lugar de *gfp*) e incluye los mismos 20 nucleótidos

adicionales que complementan con el final de transportador. De esta forma se generaron amplicones 3' con la secuencia *riboB-3'azgA* para solapar con cada uno de los transportadores.

La generación de los *cassettes* con y sin *gfp* se realizó con el objetivo de verificar que la funcionalidad de los transportadores no se viera afectada por la fusión a la proteína verde fluorescente (ver sección 4.1.5).

#### 4.1.4.2 Construcción de la cepa *A. nidulans* receptora, $\Delta ZAC \Delta nku$ *riboB2*

Para este trabajo fue necesario construir una cepa receptora que en primer lugar no tuviera los transportadores AzgA, UapA y UapC funcionales ( $\Delta ZAC$ , delección de genes *azgA*, *uapA* y *uapC*), esta cepa por lo tanto es incapaz de crecer en purinas como fuente de nitrógeno. Además que fuera auxótrofa para riboflavina (*riboB2*) de forma que permitiera la selección de transformantes y por último que favoreciera la integración de las secuencias foráneas en el *locus* elegido. El gen *nku* codifica la subunidad 1 de la helicasa II, implicada en procesos de recombinación heteróloga, eliminado este gen ( $\Delta nku$ ) se disminuye la integración de las secuencias foráneas en otros lugares del genoma y por tanto favorece la recombinación homóloga (Nayak *et al.*, 2006).

Se construyó entonces la cepa receptora  $\Delta ZAC$  *riboB2*  $\Delta nku$  por cruzamiento entre  $\Delta azgA \Delta uapA \Delta uapC::pyrGAf$  *argB2 pabaA1* y  $\Delta nku::argB^+$  *riboB2 pyroA4 pyrG89* (*argB2*, *pabaA1*, *pyroA4* y *pyrG89*, mutaciones que generan auxotrofia por arginina, ácido p-aminobenzoico, piridoxina y uracilo-uridina, respectivamente). Entre las 160 cepas *argB+* *pyrG+* analizadas, 25 fueron seleccionadas por no crecer en presencia de hipoxantina ni ácido úrico como únicas fuentes de nitrógeno y por ser resistentes al análogo tóxico 8-azaguanina (que ingresa por AzgA, ver sección 4.1.5). Estas cepas,  $\Delta azgA \Delta uapA$  y posiblemente  $\Delta uapC$ , tienen también, más de una auxotrofia incluida riboflavina.

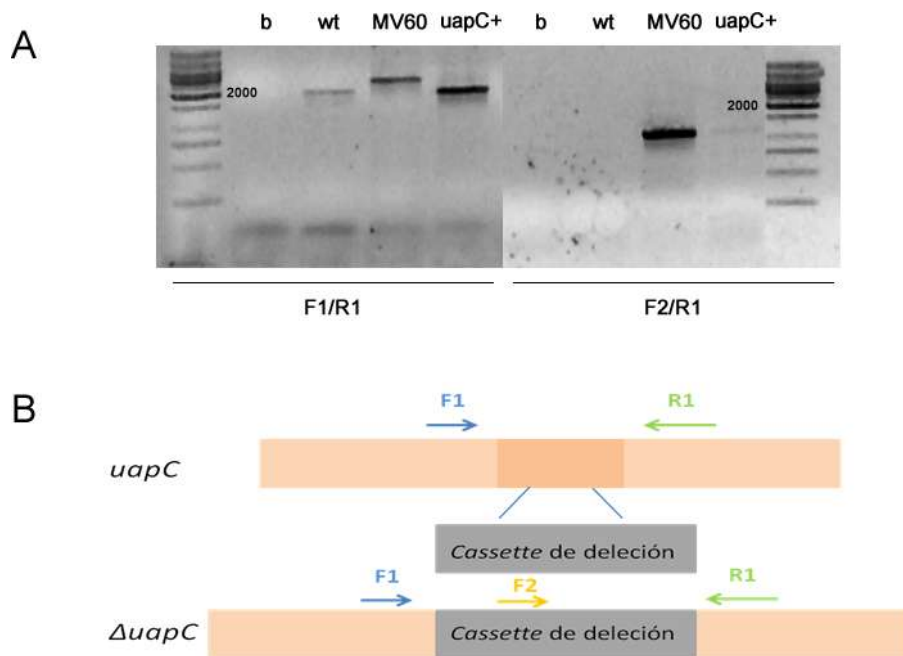
La segregación de *nku* no presenta fenotipos diferenciables por crecimiento, y los fenotipos *uapC* no son netos debido a la baja capacidad de transporte de esta proteína. Si bien las delecciones están ligadas a los marcadores *argB* y *pyrG* estos caracteres segregan además en función del alelo presente en su *locus* original. Esto quiere decir que una cepa protótrofa para arginina no necesariamente presenta la delección *nku* y una cepa protótrofa para uracilo-uridina no necesariamente es  $\Delta uapC$ , por tanto ambas delecciones se verificaron por PCR.

Para *uapC* se utilizaron dos pares de *primers*: i) *primers* situados en las secuencias flanqueantes a la delección (AN3uapC-F1 y AN5uapC-R1); ii) el *primer* ANpyrG-F2 que hibrida con *pyrG* (*cassette* de delección de *uapC*) y AN5uapC-R1 (Figura 4-10 y Tabla 7-3). Los amplicones esperados son de 1871pb y ninguno respectivamente para *uapC+*. Mientras que para  $\Delta uapC$  se

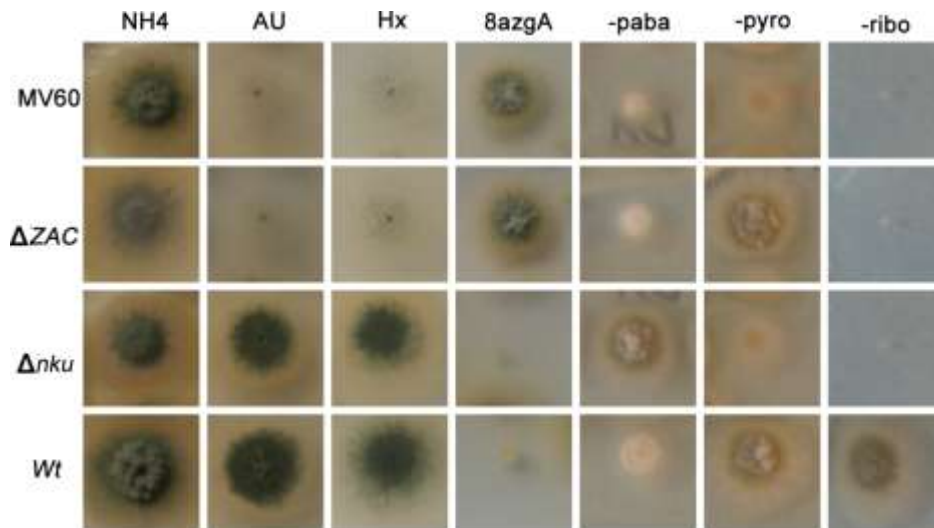
esperan amplicones de 2500pb y 1239pb, respectivamente. De las 16 cepas analizadas solo 2 son *uapC*<sup>+</sup>.

Para *nku* se analizó el ADN genómico con *primers* situados en las secuencias flanqueantes a la deleción (AN*nku*-F1 y AN*nku*-R1, Tabla 7-3). Con éstos, las cepas *nku*<sup>+</sup> producen un amplicón de 2236pb y las  $\Delta$ *nku* uno de aproximadamente 1700pb. De las 16 cepas analizadas 10 presentan la deleción en *nku*.

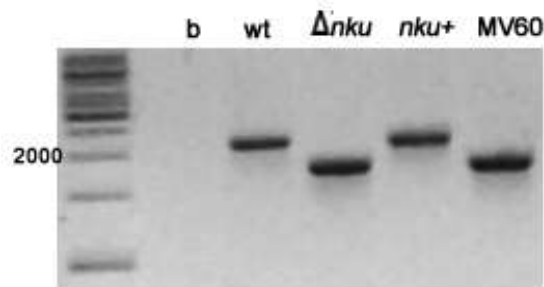
Combinando los resultados se eligió la cepa  $\Delta$ *azgA* $\Delta$ *uapA* $\Delta$ *uapC*::*pyrG*<sup>+</sup>  $\Delta$ *nku*::*argB*<sup>+</sup> *argB* +/- *pabaA1* *riboB2* *pyroA4* *pyrG* +/- denominada MV60 (+/- , indica no determinado) (Figura 4-10, Figura 4-11, Figura 4-12).



**Figura 4-10: Verificación de la deleción *uapC* de cepa receptora.** A) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con BrEt de los productos de PCR. En los carriles: sin ADN (b), ADNg de cepa: silvestre (wt),  $\Delta$ ZAC::*pyrG*<sup>+</sup>  $\Delta$ *nku*::*argB*<sup>+</sup> *riboB2* *pyroA4* *pabaA1* (MV60), cepa *uapC*<sup>+</sup> obtenida de la progenie analizada. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Por la secuencia de los *primers* referirse a Tabla 7-3. AN3*uapC*-F1 (F1), AN5*uapC*-R1 (R1), AN*pyrG*-F2 (F2).



**Figura 4-11: Test de crecimiento de cepa receptora:** MV60:  $\Delta ZAC::pyrG+$   $\Delta nku::argB+$  *pabaA1* *riboB2* *pyroA*,  $\Delta nku$ :  $\Delta nku::argB+$  *riboB2* *pyroA4* *pyrG89* (parental de cruzamiento),  $\Delta ZAC$ :  $\Delta azgA$ ,  $\Delta uapA$  y  $\Delta uapC::pyrG+$  *pabaA1* *riboB2*. Wt: silvestre *pabaA1*. Las fuentes de nitrógeno amonio (NH<sub>4</sub>), ácido úrico (AU) e hipoxantina (Hx) se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo, el crecimiento en el análogo tóxico 8azaguanina se evaluó en presencia de estos suplementos y amonio como fuente de nitrógeno. Las auxotrofías se evaluaron en presencia de amonio suplementado con uridina y uracilo y: piridoxina y riboflavina (-paba), ácido p-aminobenzoico y riboflavina (-pyro), de ácido p-aminobenzoico y piridoxina (-ribo).



**Figura 4-12: Verificación de delección *nku* de cepa receptora.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con BrEt de los productos de PCR. En los carriles: s/ADN (b), ADN<sub>g</sub> de cepa: silvestre (wt),  $\Delta nku::argB+$  *riboB2* *pyroA4* *pyrG89* ( $\Delta nku$ ),  $\Delta ZAC$   $\Delta nku::argB+$  *riboB2* *pyroA4* *pabaA1* (MV60), cepa *nku+* obtenida de la progenie analizada. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific.

La cepa MV60 tiene un bajo grado de regeneración de protoplastos ( $10^{-4}$ ) y baja eficiencia de transformación tanto con ADN circular como lineal (1 transformante/ $\mu$ gADN). La frecuencia fue medida en base a la obtención de cepas protótrofas para riboflavina, usando un plásmido *riboB+*. Esto significa un orden menos de lo esperado y de lo obtenido con la cepa  $\Delta ZAC$  *riboB2* *pabaA1* (control de transformación). La eficiencia de transformación se aumentó en un orden de magnitud, utilizando una nueva enzima de protoplastización.



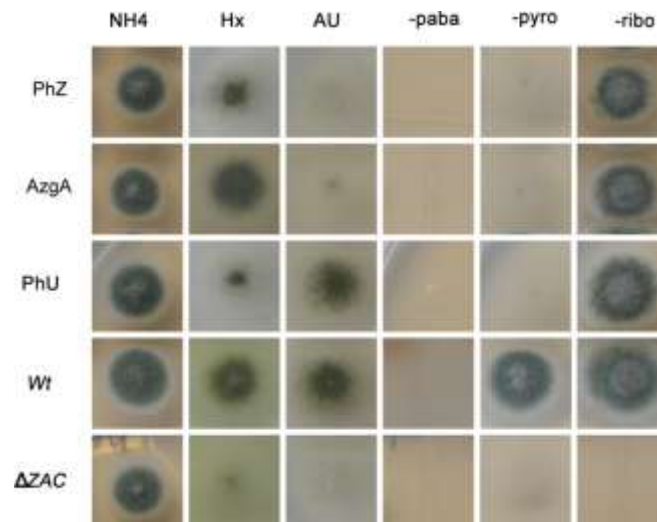
#### 4.1.4.3 Obtención y selección de transformantes

La cepa  $\Delta ZAC:: pyrG^+ \Delta nku:: argB^+ rboB2 pyroA4 pabaA1$ , se transformó con cada uno de los *cassettes* construidos (sección 4.1.4.1). Se obtuvieron 42 transformantes de *phU*, 87 de *phZ* y 146 de *azgA*, de los cuales 9, 37 y 39 no están fusionados a *gfp*, respectivamente. Se verificó que las colonias aisladas fueran transformantes mediante la evaluación de auxotrofías, la incorporación del *cassette* complementa el requerimiento de riboflavina pero no de ácido p-aminobenzoico ni piridoxina; y la evaluación del crecimiento en hipoxantina y ácido úrico. El análisis de crecimiento (Figura 4-13) mostró que todas las cepas que incorporaron *azgA* ( $AN::azgA$ ) crecen en hipoxantina al nivel de la cepa silvestre y no crecen en ácido úrico. Todos los transformantes  $AN::phZ$  mostraron un comportamiento similar a  $AN::azgA$ , no pueden utilizar ácido úrico como fuente de nitrógeno pero sí hipoxantina, si bien el crecimiento no se restituye a nivel de las cepas *azgA*<sup>+</sup> (silvestre,  $AN::azgA$ ). Finalmente, los transformantes  $AN::phU$  pueden utilizar ácido úrico como fuente de nitrógeno pero no hipoxantina. En la mitad de las cepas  $AN::phU$  aisladas el crecimiento con ácido úrico se restituye al nivel de la cepa silvestre, mientras que para las demás cepas la restitución es parcial.

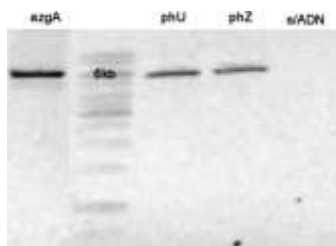
En ningún caso se detectó diferencias de crecimiento entre las cepas que tienen el transportador fusionado a GFP ( $AN::phZ-gfp$  y  $AN::phU-gfp$ ) y las que no ( $AN::phZ-s$  y  $AN::phU-s$ ). Todas las cepas  $AN::phZ$  crecen en hipoxantina de forma análoga. Algunas cepas  $AN::phU-s$  y  $AN::phU-gfp$  crecen en ácido úrico al nivel de la cepa silvestre, mientras que otras presentan menor grado de crecimiento (resultados no mostrados).

En función del fenotipo de crecimiento se seleccionaron: i) 6 transformantes *phU* ( $AN::phU$ ) de los cuales 5 tienen el gen transportador fusionado a *gfp* y 1 no tiene la fusión, ii) 5 transformantes *phZ* (3  $AN::phZ-gfp$  y 2  $AN::phZ-s$ ) y iii) 5 *azgA* ( $AN::azgA-gfp$ ) para los siguientes estudios.

La presencia del *cassette* de transformación en el genoma de las cepas seleccionadas se verificó mediante amplificación con *primers* externos (aproximadamente 6,5 kb) a partir del ADN genómico (Figura 4-14). La ausencia de un amplicón de 2600pb indica que los *cassettes* se integraron en el *locus azgA*.



**Figura 4-13: Análisis de crecimiento de transformantes:** Se muestra 1 transformante de cada transportador. PhZ: AN::*phZ-gfp*, AzgA: AN::*azgA-gfp* y PhU: AN::*phU-gfp*; Wt: *pabaA1*, ΔZAC: ΔZAC::*pyrG<sup>+</sup> Anku::argB<sup>+</sup> riboB2 pyrA4 pabaA1*. Las fuentes de nitrógeno NH4: amonio, AU: ácido úrico, Hx: hipoxantina, se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. Las auxotrofías se evaluaron en presencia de tartrato de amonio y los mismo suplementos excluyendo el indicado en cada caso, -paba: ácido p-aminobenzoico; -pyro: piridoxina, -ribo: riboflavina.



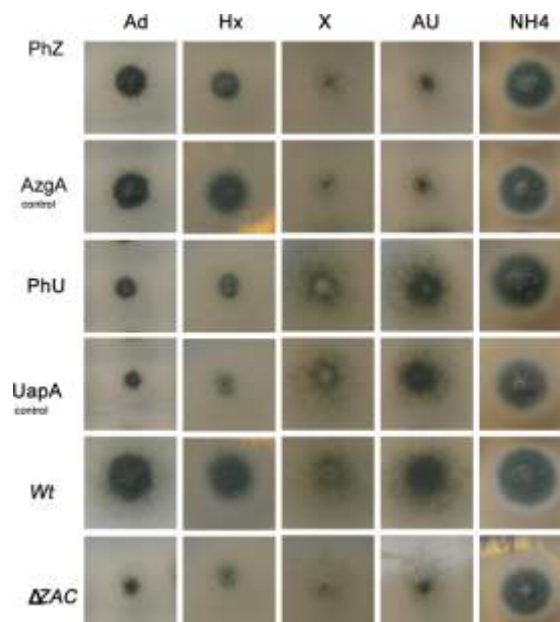
**Figura 4-14: Verificación de cassette en transformantes seleccionados:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con BrEt de los productos de PCR con *primers* que amplifican la totalidad del *cassette* (FP1AN5ZF1 y FP6AN3ZR1, Tabla 7-3). Se ejemplifica mostrando el resultado de la amplificación de ADN<sub>g</sub> de una cepa AN::*azgA-gfp* (*azgA*), una AN::*phU-gfp* (*phU*) y una AN::*phZ-gfp* (*phZ*). Control de PCR sin ADN (*s/ADN*). En ningún caso se observó una banda de aprox. 2600pb (la delección *azgA201* es de 1200pb, Cecchetto *et al.*, 2004). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific.

#### 4.1.5 Análisis del transporte de purinas, derivados y análogos

Dado que el contexto genético y por lo tanto metabólico es el mismo en todos transformantes, las diferencias de crecimiento entre estas cepas pueden asociarse a diferencias en el transporte de los sustratos. Es así que, el transporte de purinas, derivados y análogos a través de PhZ y PhU se analizó por crecimiento en medio sólido. Cuando el metabolito que se transporta es necesario para el crecimiento en *A. nidulans* (ej: única fuente de nitrógeno), el transporte produce un fenotipo de crecimiento visible y la ausencia de transporte conduce a la falta de crecimiento. Además del crecimiento normal o la falta total de crecimiento, se pueden observar fenotipos intermedios de crecimiento inferior al del tipo silvestre. En los casos donde la falta de transporte produce un fenotipo no visible, el uso de análogos tóxicos permite obtener un fenotipo discernible. Es por esto que el transporte de aquellos sustratos que no sirven como fuente de nitrógeno se analizó mediante ensayos de competencia con desplazamiento de análogos de purinas tóxicos.

El transporte a través de PhZ se evaluó en las 6 cepas AN::*phZ* seleccionadas junto con 4 cepas control AN::*azgA*. El transporte a través de PhU se evaluó en las 5 cepas AN::*phU* junto con 3 cepas control AN::*uapA* construidas mediante transformación de la cepa  $\Delta$ ZAC *riboB2 pabaA1* con el plásmido p520exp que contiene la secuencia del gen *uapA* y el gen de selección *pabaA* (complementación de la auxotrofia de ácido p-aminobenzoico).

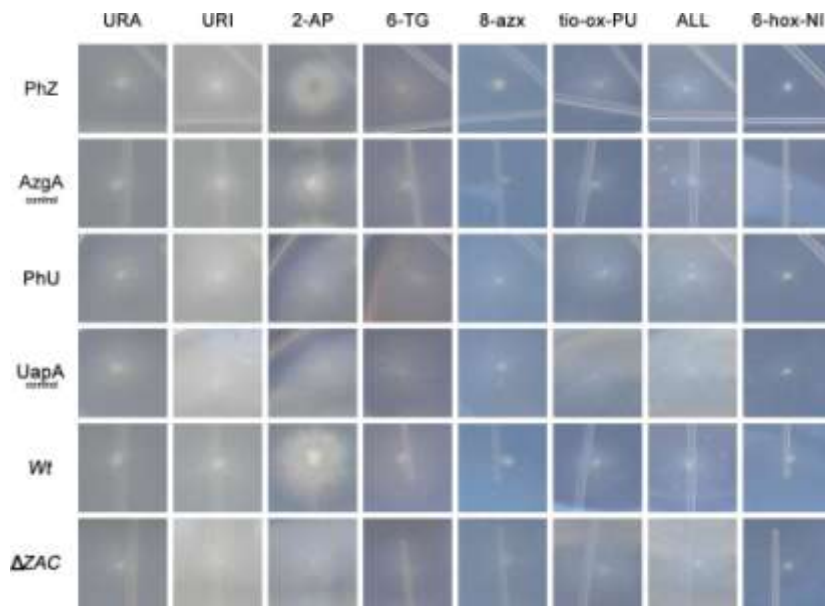
Todas las cepas AN::*phZ*, al igual que las AN::*azgA*, son capaces de crecer en presencia de adenina e hipoxantina y no puede crecer en xantina o ácido úrico. Las cepas AN::*phU* al igual que AN::*uapA* pueden crecer en xantina y ácido úrico pero difieren en que mientras las últimas presentan un fenotipo de crecimiento nulo en adenina y hipoxantina, las AN::*phU* crecen un poco más que el control sin permeasas (Figura 4-15). Esto indicaría que los transportadores de *P. chrysosporium* tienen especificidad por los mismos sustratos principales (purinas) que sus homólogos de *A. nidulans*. Con una posible diferencia, PhU podría tener un espectro más amplio transportando adenina e hipoxantina con muy baja eficiencia, aunque a este nivel de experimentos no es posible concluir.



**Figura 4-15: Transporte de purinas (Fuente de nitrógeno).** Test de crecimiento de cepas de *A. nidulans* en distintas fuentes nitrógeno: adenina (Ad), hipoxantina (Hx), xantina (X), ácido úrico (AU) y amonio (NH<sub>4</sub>), todas se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. A modo de ejemplo se muestra un transformante de cada transportador: PhZ (AN::*phZ-gfp*), AzgA (AN::*azgA-gfp*), PhU (AN::*phU-gfp*), Wt: *pabaA1*,  $\Delta$ ZAC:  $\Delta$ ZAC::*pyrG+*  $\Delta$ *uku::argB+* *riboB2 pyroA4 pabaA1* y UapA: (AN::*uapA*).

Sustratos que *A. nidulans* no utiliza como fuente de nitrógeno o que como fuente de nitrógeno son muy pobres, no pueden evaluarse directamente. Es el caso de uridina, uracilo, 2-aminopurina, 6-tioguanina, 8-azaxantina, 2-8 ditio-6-oxipurina, alopurinol y ácido 6-hidroxinicotínico (Figura

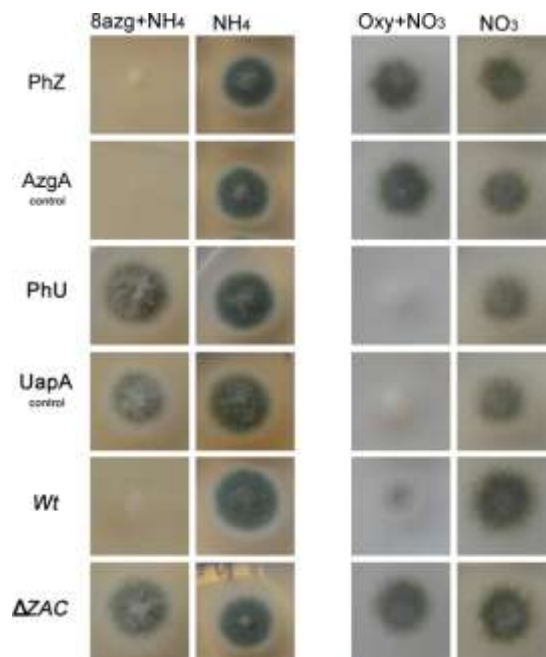
4-16). Éstos no son tóxicos, ya que *A. nidulans* silvestre crece correctamente cuando se adiciona amonio u otra fuente de nitrógeno.



**Figura 4-16. Crecimiento en análogos y derivados de purinas.** Test de crecimiento de cepas de *A. nidulans* en análogos y derivados de purinas como única fuente de nitrógeno: uracilo (URA), uridinas (URI), 2-aminopurina (2-AP), 6-tioguanina (6-TG), 8-azaxantina (8-azx), 2,8-ditio-6-oxipurina (tio-ox-PU), alopurinol (ALL) y ácido 6-hidroxicotínico (6-hox-NI), todas las condiciones se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. A modo de ejemplo se muestra un transformante de cada transportador: PhZ (AN::phZ-gfp), AzgA (AN::azgA-gfp), PhU (AN::phU-gfp), Wt: *pabaA1ΔZAC: ΔZAC Δnku::argB+ riboB2 pyroA4 pabaA1* y UapA: (AN::uapA).

Para visualizar el transporte de este tipo de sustratos se realizaron ensayos de competencia en presencia de análogos de purinas tóxicos. En estos ensayos, se utiliza una fuente de nitrógeno que no es transportada por la proteína en estudio (amonio, nitrato) por lo que todas las cepas pueden crecer como la cepa silvestre. Al adicionar al medio un sustrato tóxico transportado por estas proteínas, no habrá crecimiento. Finalmente si además del sustrato tóxico se adiciona otro sustrato (no tóxico) que entre a la célula por el mismo transportador, competirá con el anterior disminuyendo su ingreso al organismo, lo que se traduce en restitución del crecimiento. De esta forma el restablecimiento del crecimiento es indicativo de transporte.

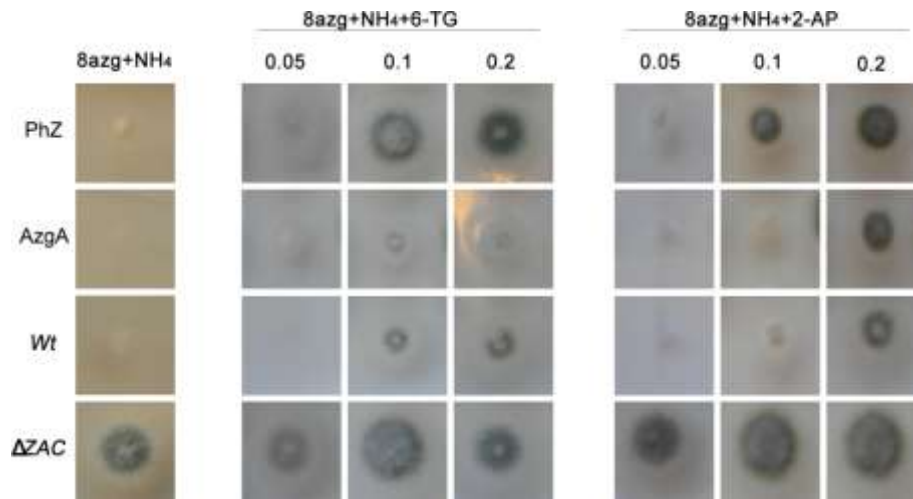
La 8-azaguanina y el oxypurinol son análogos tóxicos para *A. nidulans* que ingresan por AzgA y UapA respectivamente y demostramos que son también transportados por PhZ y PhU. El oxypurinol es transportado por PhU y UapA en el mismo grado mientras que la 8-azaguanina parece ser transportada algo más eficientemente a través de AzgA que de PhZ (Figura 4-17).



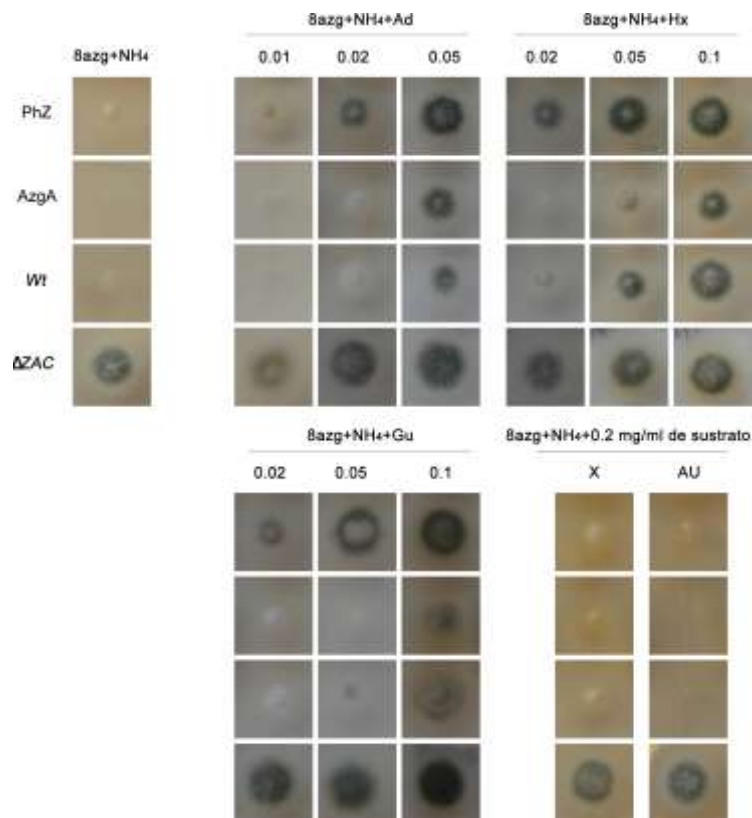
**Figura 4-17: Análogos de purinas tóxicos.** Test de crecimiento en: 8-azaguanina + amonio (8azg+NH<sub>4</sub>) y Oxypurinol + nitrato (Oxy+NO<sub>3</sub>), amonio (NH<sub>4</sub>) y nitrato (NO<sub>3</sub>) todas las condiciones se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. A modo de ejemplo se muestra un transformante de cada transportador. PhZ (AN::phZ-gfp), AzgA (AN::azgA-gfp), PhU (AN::phU-gfp). Se incluyen la cepas control Wt: *pabaA1ΔZAC*: *ΔZAC Δnku::argB+ riboB2 pyroA4 pabaA1* y UapA: (AN::uapA).

El transporte de los sustratos: uridina, uracilo, 2-aminopurina, 6-tioguanina, 8-azaxantina, 2-8 ditio-6-oxipurina, alopurinol y ácido 6-hidroxinicotínico, se evaluó entonces mediante ensayos de competencia con los análogos tóxicos (8-azaguanina en el caso de PhZ y oxypurinol en el caso de PhU) a distintas concentraciones de cada sustrato. Además, con el objetivo de comparar el transporte de los distintos sustratos, las purinas que son fuente de nitrógeno, también se analizaron por competencia con estos análogos tóxicos. La medida de eficiencia de transporte se definió como la mínima concentración de sustrato que es capaz de desplazar al tóxico, restableciendo el crecimiento. En estos ensayos el término eficiencia involucra tanto afinidad por el sustrato como capacidad de transporte.

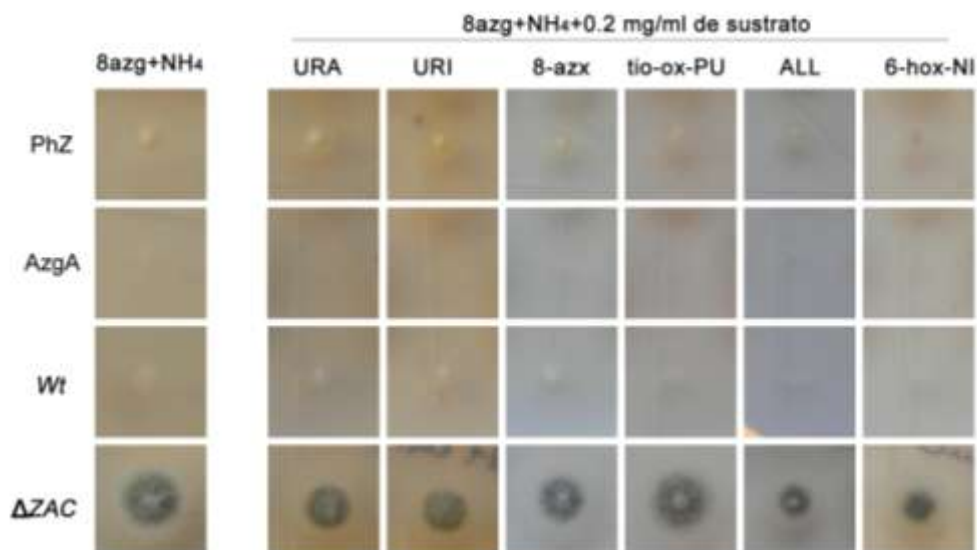
PhZ, al igual que AzgA, transporta 6-tioguanina, 2-aminopurina, adenina, hipoxantina, guanina y 8-azaguanina y no se detectó transporte de xantina, ácido úrico, uridina, uracilo, 8-azaxantina, 2-8 ditio-6-oxipurina, alopurinol y ácido 6-hidroxinicotínico (crecimiento igual a cepa *ΔZAC*). Los sustratos son transportados con diferentes eficiencias (Figura 4-18, Figura 4-19, Figura 4-20): PhZ muestra mayor eficiencia para hipoxantina y adenina que para guanina, y es aún menor para 6-tioguanina y 2-aminopurina. Mientras que en AzgA el transporte de adenina es más eficiente que el de hipoxantina y guanina, en menor grado se transporta 2-aminopurina y aún con menor eficiencia se transporta 6-tioguanina. Estos resultados indicarían que ambos transportadores comparten los mismos sustratos, si bien presentan diferencias en el proceso de transporte.



**Figura 4-18: Análogos y derivados de purinas que transporta PhZ.** Ensayos de competencia, se muestra el crecimiento en: 8-azaguanina + amonio (8azg+NH<sub>4</sub>), 8-azaguanina + amonio + distintas concentraciones de sustrato 6-TG: 6-tioguanina y 2-AP: 2-aminopurina (0,05; 0,1 y 0,2 mg/ml). Todas las condiciones se evaluaron en presencia de ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhZ (AN::*phZ-gfp*), AzgA (AN::*azgA-gfp*). Wt: *pabaA1* ΔZAC: ΔZAC Δ*nku*::*argB*+ *riboB2* *pyroA4* *pabaA1*.



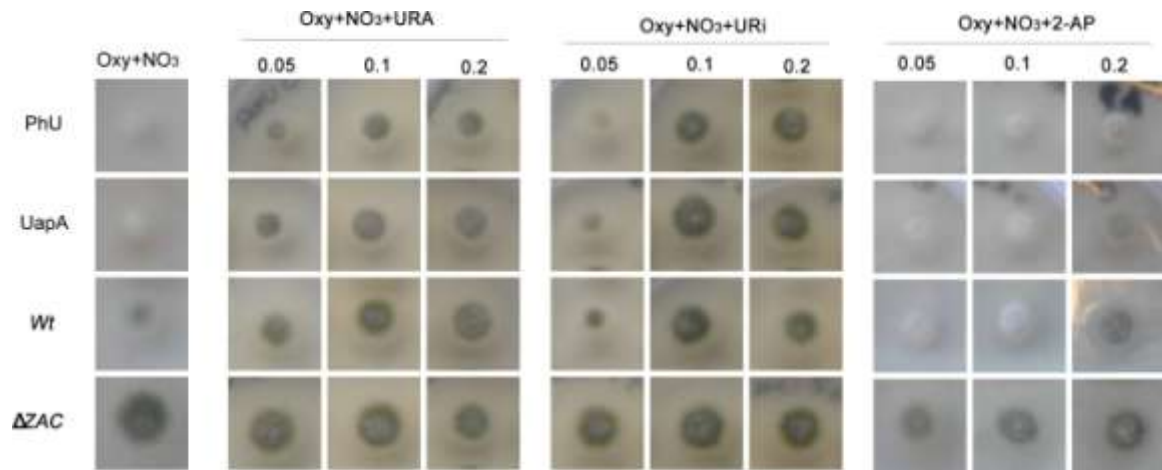
**Figura 4-19: Transporte de purinas a través de PhZ (competencia).** Ensayos de competencia, se muestra el crecimiento en: 8-azaguanina + amonio (8azg+NH<sub>4</sub>), 8-azaguanina + amonio + distintas concentraciones de sustrato: Ad: adenina (0,01; 0,02 y 0,05 mg/ml); Hx: hipoxantina (0,02; 0,05 y 0,1 mg/ml), Gu: guanina (0,02; 0,05 y 0,1 mg/ml), X: xantina y AU: ácido úrico (0,2 mg/ml). Medios suplementados con ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhZ (AN::*phZ-gfp*), AzgA (AN::*azgA-gfp*), Wt: *pabaA1*, ΔZAC: ΔZAC Δ*nku*::*argB*+ *riboB2* *pyroA4* *pabaA1*.



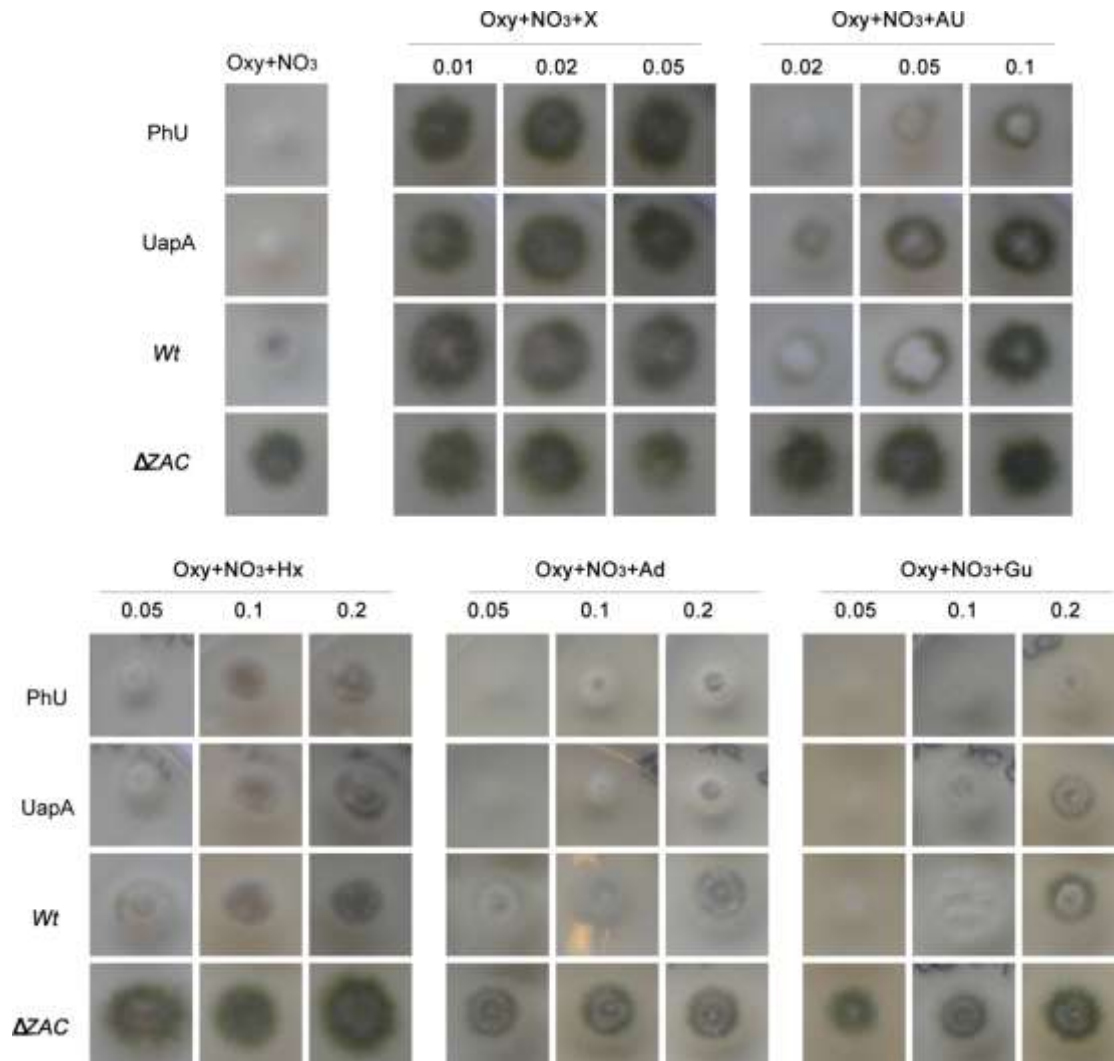
**Figura 4-20: Análogos y derivados de purinas no transportados por PhZ.** Se muestra el crecimiento en: 8-azaguanina + amonio (8azg+NH<sub>4</sub>) y los ensayos de competencia en 8-azaguanina + amonio + 0,2 mg/ml de sustratos: uracilo (URA), uridinas (URI), 8-azaxantina (8-azx), 2,8-ditio-6-oxipurina (tio-ox-PU), alopurinol (ALL) y ácido 6-hidroxinicotínico (6-hox-NI). Medios suplementados con ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhZ (AN::phZ-gfp) y AzgA (AN::azgA-gfp), Wt: pabaA1, ΔZAC: ΔZAC Δnku::argB+ riboB2 pyroA4 pabaA1.

PhU, al igual que UapA, transporta 2-aminopurina, uridina, uracilo, xantina, ácido úrico, hipoxantina, adenina, guanina y oxypurinol y no se detectó transporte de: 6-tioguanina, 8-azaxantina, 2-8 ditio-6-oxipurina, alopurinol y ácido 6-hidroxinicotínico. La eficiencia con la que los sustratos son transportados es diferente. PhU transporta xantina mejor que uridina y uracilo; menos eficientemente transporta ácido úrico y con menor eficiencia hipoxantina, 2-aminopurina, adenina y guanina. El de *A. nidulans* también transporta xantina con la mayor eficiencia detectada pero el transporte de ácido úrico, uridina y uracilo es al mismo nivel, en menor grado transporta 2-aminopurina, hipoxantina, adenina y guanina. (Figura 4-21, Figura 4-22, Figura 4-23). Esto explica porque las cepas AN::PhU crecen mejor en hipoxantina y adenina que las cepas AN::UapA (Figura 4-15), el transporte de hipoxantina y adenina por UapA es mínimo (sólo se detecta en competencia) y podría considerarse despreciable.

Estos resultados permiten concluir que PhU y UapA transportan los mismos sustratos y al igual que PhZ y AzgA presentan diferencias en el proceso de transporte.



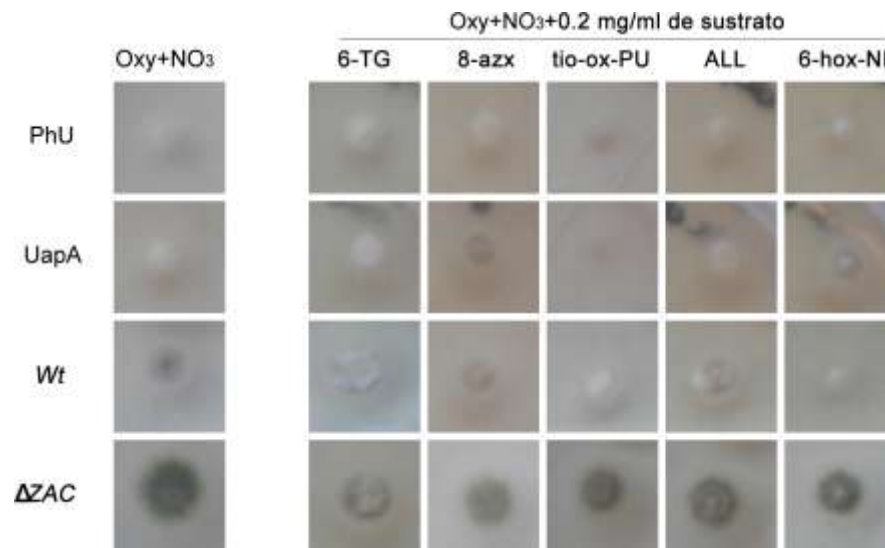
**Figura 4-21: Análogos y derivados de purinas que transporta PhU.** Ensayos de competencia, se muestra el crecimiento en oxypurinol + nitrato (Oxy+NO<sub>3</sub>), Oxypurinol + nitrato + distintas concentraciones (0,05; 0,1 y 0,2 mg/ml) de sustrato. URA: uracilo, URI: uridina, 2-AP: 2-aminopurina. Medios suplementados con ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhU (AN:*phU-gfp*), UapA (AN:*uapA*), Wt: *pabaA1* ΔZAC: ΔZAC Δ*kuu::argB+riboB2 pyroA4 pabaA1*.



**Figura 4-22: Transporte de purinas a través de PhU (competencia).** Sigue en página 60.



(Continuación **Figura 4-22**, página 59). Ensayos de competencia, se muestra el crecimiento en oxypurinol + nitrato (Oxy+NO<sub>3</sub>), Oxypurinol + nitrato + distintas concentraciones de sustrato (La concentración medida en mg/ml se indica en la figura). X: xantina, AU: ácido úrico, Hx: hipoxantina, Ad: adenina, Gu: guanina Medios suplementados con ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhU (AN::*phU-gfp*), UapA (AN::*uapA*), Wt: *pabaA1*ΔZAC: ΔZAC *Anku::argB+riboB2 pyroA4 pabaA1*.



**Figura 4-23: Análogos y derivados de purinas no transportados por PhU.** Se muestra el crecimiento en: Oxypurinol + nitrato (Oxy+NO<sub>3</sub>) y los ensayos de competencia en Oxypurinol + nitrato+ 0,2 mg/ml de sustratos: 6-tioguanina (6-TG), 8-azaxantina (8-azx), 2,8-ditio-6-oxipurina (tio-ox-PU), alopurinol (ALL) y ácido 6-hidroxinicotínico (6-hox-NI). Medios suplementados con ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. PhU (AN::*phU-gfp*), UapA (AN::*uapA*), Wt: *pabaA1* ΔZAC: ΔZAC *Anku::argB+ riboB2 pyroA4 pabaA1*.

Por último cabe mencionar que en ningún caso se detectó diferencias de crecimiento entre las cepas que tienen el transportador fusionado a GFP y las que no. Los fenotipos de crecimiento de cada grupo de cepas fueron similares, los resultados que en la figuras se ejemplifican con un solo transformante de cada transportador, se repitieron para las 6 cepas AN::*phZ*, 4 AN::*azgA*, 5 AN::*phU* y 3 cepas AN::*uapA* (resultados no mostrados).

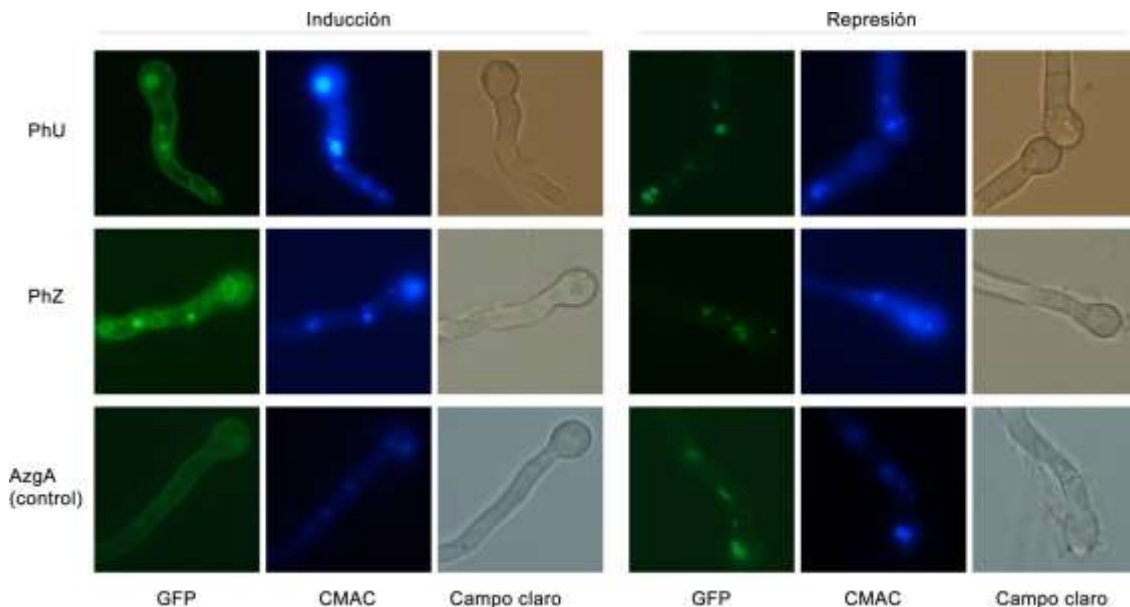
#### 4.1.6 Localización subcelular de los transportadores PhZ y PhU

La regulación post-traducciona l de los transportadores funciona mediante procesos de ubiquitinación, endocitosis y degradación mediante la vía endosomal/vacuolar. La mayoría de los transportadores son dirigidos a la membrana plasmática pero frente a determinadas condiciones (cambios en la fuente disponible de nitrógeno, stress o la presencia de algún sustrato en exceso) los transportadores son re-dirigidos a las vacuolas para su degradación.

La localización subcelular de los transportadores PhZ y PhU se estudió mediante su fusión a la proteína verde fluorescente (GFP). Utilizando microscopía de fluorescencia se observó la localización de los transportadores en 3 cepas AN::*phZ-gfp* y 3 cepas AN::*phU-gfp* luego de la germinación, tanto en presencia de sustrato como en presencia de amonio. Como control se

analizó la localización del transportador *AzgA* de *A. nidulans*, utilizando 2 cepas AN::*azgA-gfp*. El total de cepas analizadas para cada transportador mostraron en mismo comportamiento.

El comportamiento de *AzgA* fue el esperado, en presencia de hipoxantina el transportador se localiza mayoritariamente en la membrana y se observa algo de proteína en vacuolas evidenciada como la fluorescencia citoplasmática que se corresponde con el colorante vacuolar (CMAC). En presencia de represor la cantidad de proteína en vacuolas aumenta notoriamente y no hay transportador asociado a la membrana (Figura 4-24). Al estudiar los transportadores de *P. chrysosporium* se observa que en presencia de sustratos la fluorescencia en las cepas AN::*phU-gfp* se localiza en la membrana y en vacuolas mientras que en amonio sólo se observa en las vacuolas. Al igual que *AzgA* y *PhU*, *PhZ* bajo represión se localiza en vacuolas y en inducción se localiza en la membrana citoplasmática y en vacuolas pero en las cepas AN::*phZ-gfp* en presencia de sustrato también se observa fluorescencia en anillos citoplasmáticos, que se podrían corresponder con el retículo endoplasmático (Figura 4-24). En condiciones inductoras *PhZ* y *PhU*, con respecto al control *AzgA*: parecen tener un nivel de fluorescencia mayor y la cantidad de transportador que se localiza en vacuolas es notoriamente mayor. Dado que ambos genes fueron clonados bajo el promotor de *azgA*, es esperable que no tengan diferencias en la expresión génica. Estos resultados estarían indicando diferencias durante el procesamiento y/o tránsito proteico que podrían estar asociados a la estructura de los transportadores.



**Figura 4-24: Localización subcelular de PhZ y PhU.** Microscopía de Epifluorescencia de PhU-GFP, PhZ-GFP y AzgA-GFP. Se observa la regulación de los transportadores bajo el promotor de *azgA* en condiciones inductoras (hipoxantina y ácido úrico) y represoras (amonio). Para cada panel se muestra la fluorescencia de la GFP a la izquierda, al medio la tinción vacuolar con CMAC y a la derecha el campo claro de la correspondientes figura.

## 4.2 Estudio del transportador de purinas de *Punctularia atropurpurascens*

Previo a esta tesis observamos que el basidiomycota *Punctularia atropurpurascens* puede utilizar purinas como fuente de nitrógeno y posee un transportador similar a AzgA. Debido a que el genoma de *P. atropurpurascens* no se encuentra secuenciado, para evidenciar la presencia de transportadores de purinas se utilizaron *primers* degenerados obteniéndose una secuencia parcial del gen *puZ* que fue extendida hacia los extremos utilizando la técnica ST-PCR (Semi-random, Two-step PCR, (Chun *et al.*, 1997)) (ver sección 2.9). Mediante alineamiento de secuencia se determinó que la secuencia parcial (aprox. 1200 pb) obtenida se correspondía con la parte central del gen (Barraco Vega, Richero, Libisch, Cerdeiras, y Cecchetto, resultados no publicados).

### 4.2.1 Análisis de PuZ

Para completar el clonado del gen *puZ* se utilizó la técnica de RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) que permite amplificar tanto el extremo 3' como 5' (Yeku & Frohman, 2011). Los ADNc se sintetizaron a partir de ARNm producidos en condiciones de inducción (medio mínimo, químicamente definido sin fuente de nitrógeno (ver sección 4.2.2.2) y los *primers* (*puZ-qF6*, *puZ-qF16*, *puZ-qR6*, *puZ-qR17*, *puZ-qR18*) fueron diseñados a partir de la secuencia de *puZ* conocida (Figura 4-25).

Para el extremo 3' se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500pb que fue clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen). 14 clones de los obtenidos fueron analizados mediante secuenciado, con lo cual se obtuvo la secuencia de nucleótidos que codifican la parte terminal de la permeasa. Aunque se probaron distintas condiciones de amplificación no fue posible obtener un amplicón del extremo 5'. Actualmente disponemos de una secuencia parcial del gen *puZ* a partir de la cual se deduce una secuencia aminoacídica de 494 residuos (Figura 4-25).

Se determinó que la secuencia parcial de PuZ presenta alta similitud con las proteínas *AzgA-like* de función verificada: 84% y 75% con PhZ, 73% y 57% con AzgA, 71% y 55% con AfAzgA, 69% y 50% con AtAzg1 y 64% y 44% con AtAzg2 (similitud e identidad respectivamente). Se identificaron 29 de los 34 residuos invariantes y tres de los cuatro motivos conservados (ver sección 4.1.2.). El motivo 1 y los residuos invariantes F22, E41, M52, Y54, V58 se ubicarían en la región de la proteína que queda por determinar (Figura 4-26).

```

1  VEEVRODLITTTAAVSAALASCLNGLLANLP IGL
   GTTGAGGAGGTCGGCAGGATCTAAT7ACGACCCACCGCGCCGTGTCGGCACTGGCGTCTGCTTGATGGGCTTGTAGCCAACCTTGCCGATCGGACTCG

101  A P G L G L N A Y
   CGCCCGGTTTGGGCTGAACGCATACgtgagtgggtttttgttaettggcgtggggtccgctcgaggaccagggcattgctgtcaactgcactcagct

201  F T Y S I V G F H D S G Q
   cggggcgtcgtggttacagctccatctgagattgctgctgctaatogaagatctgtatagTTACGTATAGCATCGTGGGTTCCATGACTCGGGCCAG

301  I T Y O E A L A A V F L E G W V F
   ATAACATATCAGGAAGCGCTCGCAGCCGTTTCTCGAAGgacagtttettaetteactgtctggtttetattttetgacccccatgagagCTGGGTTCG

401  V I L S L L G L R Q N L A R I M P O S L V L A V G A G I G L F I A F
   TCATATTGTCGCTCCTGGGCTCTCGACAATGGCTAGCGCGTATCATGCCCGAGTCTTGGTATTTGGCGTTGGCGCTGGCATCGGCTTGTATCGGCTT
   ← R18
   I G L H G G L F V I
501  CATCGGCTATgtgagcatttgggtgcaagccatgtgggggataggggtgctgactccggttttccctctcggtatagCAAATGGCGGCTTTTTCGTGATC

601  G G D Q T N F V G L G G C K T E
   GGTGGGACCCAGCAGCAATTCGTTGGCCTTGGAGGTTGCAAAACGGAAgtagagctgctctcttctgatttccatoggactcttttaggctgccccat

701  D O F A N L S G Y C E R G V L O L P T H M L G I F C G G
   tgacaacataatgagATCAATTCCGGAACCTCTCTGGCTATTGCGAGCATGGCGTCTCCAGCTTCCAACGATGTGGCTCGGCATCTTCTGGGGGAA
   ← R17

801  I L T L L L M L Y R V K G A I L I G I F L V S I I S M P R P T S V T
   TCTGACATTGCTCCTCATGCTCTACCGGTTAAAGGCGGATCCTCATCGGCATCTTCTCGTCTCCATCATCTCTGGCCCCGTCGAGCTCGCTTAC

901  A F P H T P T G D T A F E F F K K V V T F R P L K R V G N V L D Y
   CCGCTTCCGCATACGCCACCGGTGACACCGCTTCGAGTTCCTCAAGAAGTCTGCACTTCCGCCCCGTTGAAACGCGTGGCAACGCTGCTGACTAC

1001  H Y G N G R V W Y A L V T F L Y V D I L D T T G T L Y S M A K F A
   CACTACGGCAACGGCCGGTCTGGTACGGCTCGTACAGTCTCTACGTCGACATCTCGACACGACGGGCACTCTCTACTCGATGGCCAAAGTTTGGCG

1101  G L R D P V T L D F E R S T V A Y C V D A F S I S M G A L H G T S P
   GCTTGGCGACCCGGTACCGCTCGATTTCGAGAGGAGCCCGTGGGCTACTGOSTGACCGCTTCTCGATCAGTATGGGCGGTTGATGGGCACCGCC
   → F6
   V T A F I E S A T G I S
1201  TGTGACGGCTTTCATCGAGAGCGCCACCGCATTTCGGatagctgtgcccgtgatccgagggggagggttttctggaaggatgtttcttgtggogaata
   ← F16/R6
   E G G R T G I T A I T T G L M F F V S V V F F A P I F A S I P P H A
1301  gAGGGTGGACGGACAGGTATCACCGGATCACGAGGGGCTCATGTCTTCTGTCAGCGTCTTCTTCGCCCTATCTTCTGCTCCATACCCOCTTGGGCGA

1401  T G S A L V I V G C L M I R N V K E I N M D Y V G D A I P A F L T I
   CCGGAAGTGGCTCGTCTCGTGGCTGCTTGATGATCCGCAAGTCAAGGAGATCAACTGGGACTACGTCGGTGACCAATACCCGGCTTCTGACCAT

1501  I I I P L S Y N I A Y G I I A G L G S Y I A I N G P A W I L M X I
   CATCATTATCCCTCTGCTGTAACATCCGCTACGGCATCATCGCCGGCTGGGCTCTACATAGCCATCAACGGCCGGCTTGGATCTCATGAAGATT

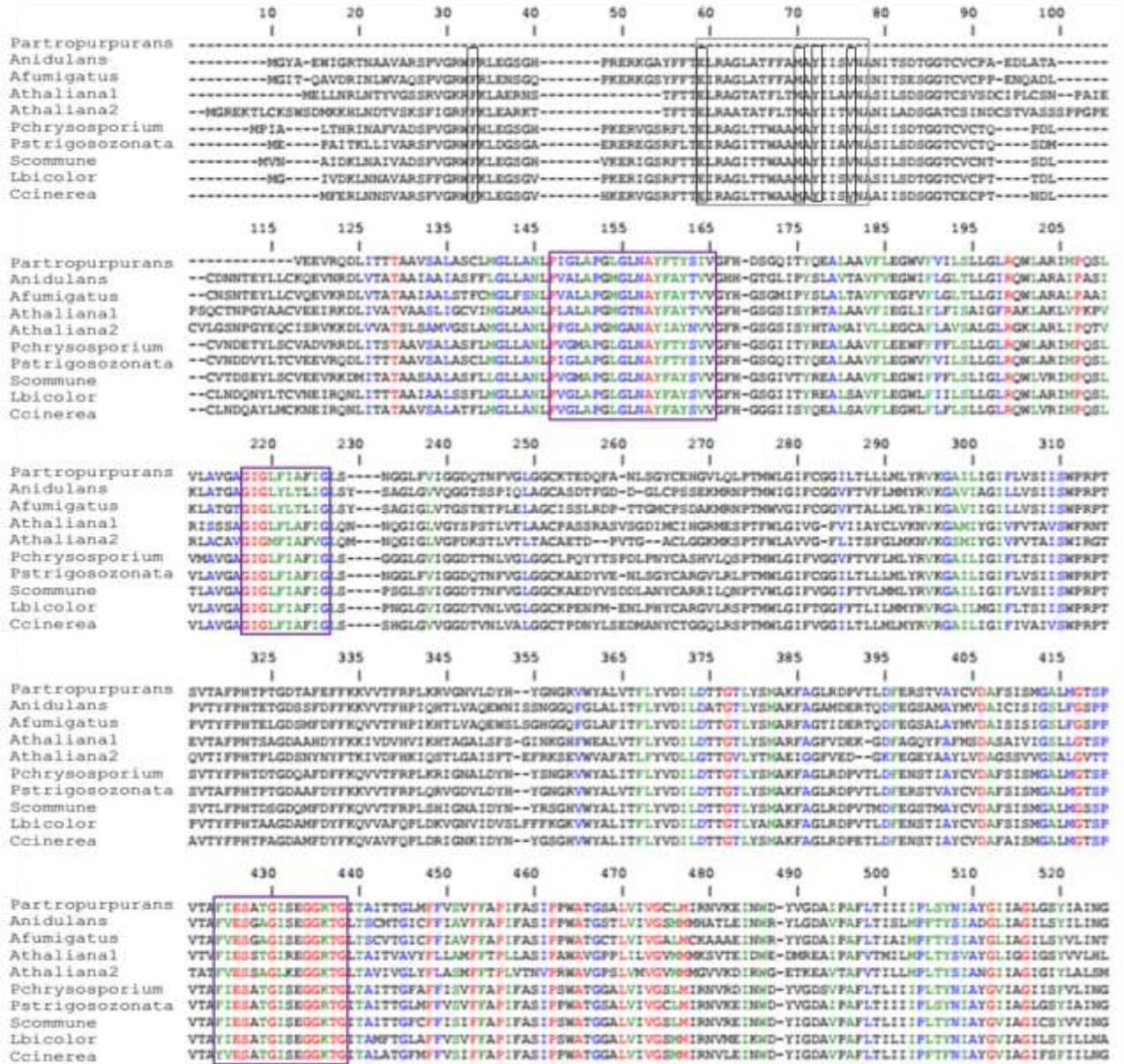
1601  S G G R I I P A R Y E Y S E E W I V P P G G L V P I W F Q K L T G
   TCCGGCGGACGTATTATCCCGCGCATTACGAATACTCGGAAGAGTGGATCGTCCACCGGGCGGCTTGTACCCATCTGGTTTCAAAGCTCACGGGA

1701  R Y Q D P H L D P F O E L O S R O E N S I D H A E S A H G D A L R Q
   GATATCAAGACCCACACTTGGACCCCGCGCAGGAGCTGCAGAGCCGACAAGAACTCGATCGATATGGCGAGTCTGGCACGGGACCGCTCCGGCA

1801  K F E A T F R C G H P D N I I E Q F L G *
   GAAGTTCGAGGGGACGTTTCGGTGGGTATCCGGACAACATCATTGAACAATTTTGGGCTAA

```

Figura 4-25 : Secuencia parcial de PuZ. La región marcada con la línea continua es la obtenida mediante *primers* degenerados y ST-PCR, donde los motivos pie de intrón se indican con subrayado. La región marcada con línea punteada es la obtenida mediante RACE 3'. Los *primers* utilizados en RACE se indican con flechas.

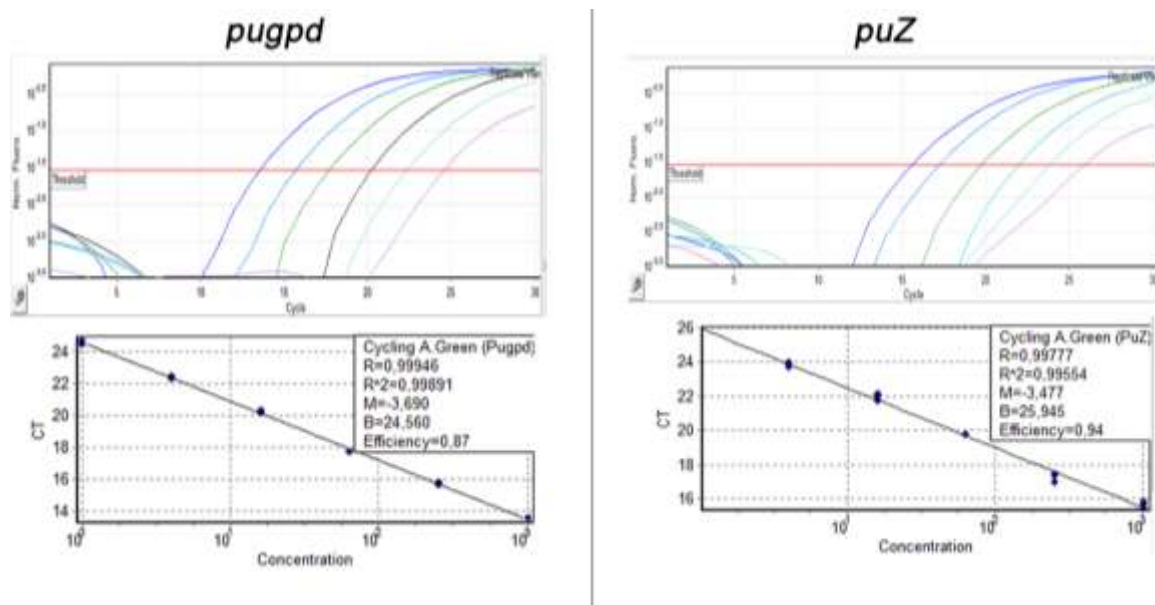


**Figura 4-26: Alineamiento PuZ y homólogos AzgA-like.** Alineamiento mediante *ClustalW* de la secuencia parcial de la proteína de *P. atropurpurascens* (PuZ), *AzgA-like* de función conocida y 144 proteínas (para referencia de las secuencias ver sección 7.2.4). Los residuos invariantes se muestran en rojo. Los motivos conservados se muestran recuadrados en negro. En recuadro gris se indica el motivo ubicado en la región de PuZ que queda por determinar y en negro los residuos F22, E41, M52, Y54, V58. En la figura se omitieron los residuos de la posición 526-631 del alineamiento por no presentar datos relevantes. Solo se muestran las secuencias de PuZ, 5 *AzgA-like* de función conocida (PhZ, *AzgA*, *AfAzgA*, *Atz1* y *AtAzg2*), 4 proteína hipotéticas de basidiomycotas: *Schizophyllum commune*, *Laccaria bicolor*; *Coprinopsis cinerea*, y *Punctularia strigosozonata*.

### 4.2.2 Estudios de expresión génica de *puZ*

La regulación a nivel transcripcional del gen *puZ* se estudió midiendo la acumulación de ARNm mediante qRT-PCR utilizando como gen de referencia el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) que ya ha sido utilizado como gen de referencia en estudios anteriores (Ibáñez, 2010). Los *primers* para la amplificación de *puZ* fueron diseñados a partir de la secuencia clonada (*puZ-qF6* y *puZ-qR6*) y evaluados al igual que los que amplifican el gen de referencia

(*pugpd*-qF y *pugpd*-qR) mediante PCR en tiempo real utilizando como molde tanto ADNc como ADNg. El ARNm se obtuvo a partir de un cultivo con hipoxantina como fuente de nitrógeno. Se eligió esta condición con el supuesto de que podría ser una condición de inducción o por lo menos una condición no reprimida (por similitud con *phZ* y *azgA*). Los amplicones de *puZ* (100pb) presentaron curvas de *melting* con picos únicos a una temperatura de fusión de  $84,8\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  y los de *pugpd* (157pb) de  $84,2\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . La identidad de los productos de amplificación se verificó mediante secuenciado (previo clonado). La eficiencia de amplificación de cada par de *primers* se determinó a partir de una curva de *Ct* versus concentración de ADN realizada con diluciones de ADN seriadas al cuarto. Cada punto de la curva se determinó por triplicado aceptándose una diferencia de *Ct* de hasta 0.5 entre los mismos. Para *puZ* se obtuvo una eficiencia de amplificación de 0,94 y para *gpd* de 0,87 (Figura 4-27).



**Figura 4-27: Determinación de eficiencia de amplificación de *pugpd* y *puZ*.** *Primers*: *pugpd*-qF/*pugpd*-qR y *puZ*-qF6/*puZ*-qR6, se muestra la curva de amplificación de un análisis por triplicado (diluciones 1/4) y las respectivas curvas estándar y parámetros de regresión lineal.

#### 4.2.2.1 Determinación del tiempo de inducción-represión

Para estudiar la expresión de un gen es necesario determinar el tiempo óptimo de cultivo, definiéndolo como el tiempo de cultivo necesario para que la acumulación de ARNm llegue a un máximo. La determinación de dicho tiempo para el sistema en estudio se determinó mediante cinéticas de acumulación de ARNm de *puZ*.

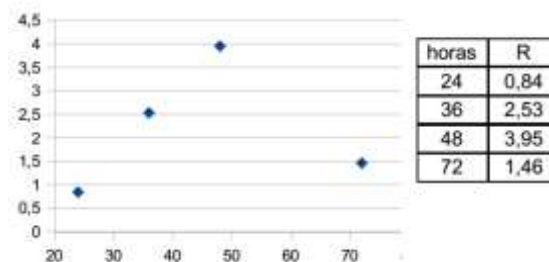
Dado que el objetivo es analizar la expresión en el micelio maduro, en una primera etapa todos los cultivos se realizaron en medio con urea hasta la formación del micelio maduro. A los 7 días de la inoculación la cantidad de cultivo es suficiente para los análisis posteriores, por tanto se fijó como tiempo para el cambio de fuente de nitrógeno 7 días después de la inoculación.

Para la cinética, ocho medios suplementados con urea (cuatro tiempos de incubación), fueron inoculados con  $10^5$  esporas e incubados a 28°C. A los 7 días de la inoculación (tiempo 0), la mitad de los cultivos fueron transferidos a medios con hipoxantina, la otra mitad a medios con urea y se continuó la incubación. Un cultivo de cada tipo fue retirado a diferentes tiempos después del cambio de medio: 24 horas, 36 horas, 48 horas y 72 horas.

A partir de cada cultivo se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc. Los ADNc se evaluaron por amplificación del gen de referencia (*gpd*) obteniéndose una diferencia de Ct de  $\pm 1$  ciclo aproximadamente y el único pico en las curvas de *melting* a los 84,2 °C.

Una vez evaluados los ADNc, se hicieron las amplificaciones de *puZ* y *pugpd* por duplicado, aceptándose una diferencia Ct de hasta 0,5 entre los mismos. El análisis de datos se realizó mediante el método de Pfaffl (2001) utilizando los cultivos en urea como condición calibrador.

La cinética obtenida mostró que el máximo de acumulación de ARNm de *puZ* se da a las 48 horas después del cambio de medio, fijándose como el tiempo óptimo de análisis.



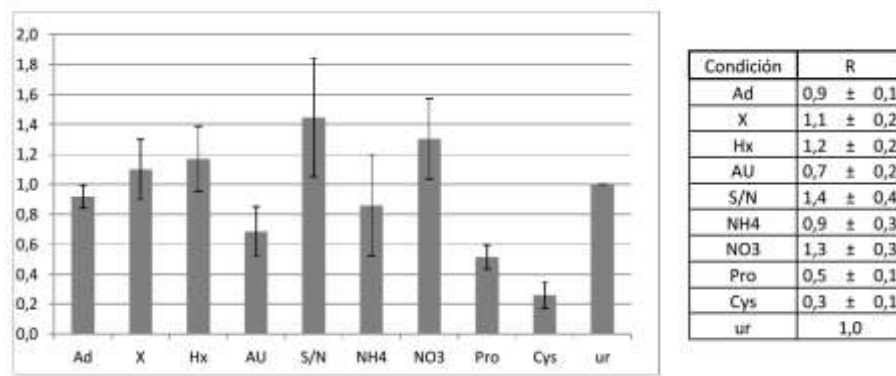
**Figura 4-28 : Cinética de expresión de *puZ*.** Gráfica de coeficiente R en función del tiempo según Pfaffl, con urea como condición calibradora y eficiencias: 0,87 (gen de referencia) y 0,94 (gen de interés).

#### 4.2.2.2 Expresión transcripcional de *puZ*

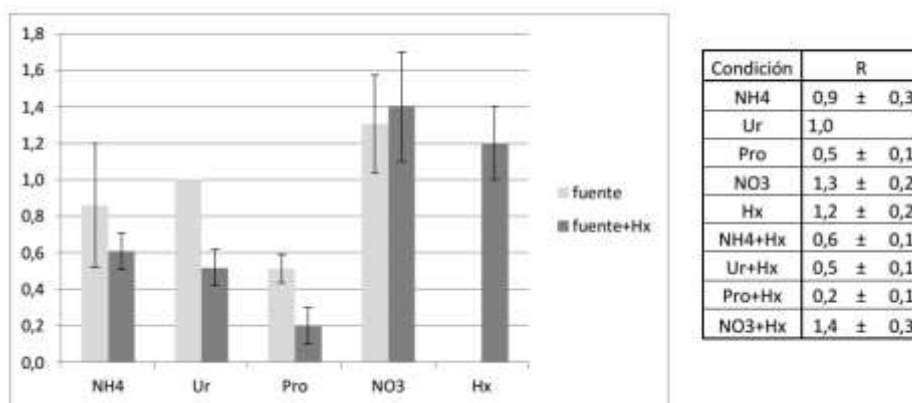
Se realizaron dos ensayos independientes de 10 cultivos de *P. atropurpurascens* según procedimiento, inóculo, medio, temperatura y tiempos de incubación, establecidos (sección 4.2.2.1), siendo las fuentes de nitrógeno finales amonio, urea, adenina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, nitrato, prolina, cisteína y, sin nitrógeno. A partir del micelio obtenido en cada cultivo se purificó el ARN y se sintetizó el ADNc por duplicado. Todos los ADNc se evaluaron usando el gen de referencia *gpd*. Cada ADNc obtenido, cuatro para cada condición, se amplificó en reacciones independientes y por duplicado, aceptándose una diferencia de Ct de hasta 0,5 entre los mismos. Los valores de R obtenidos en cada ensayo de PCR tiempo real, fueron promediados. La

acumulación de ARNm de *puZ* es el resultado de promediar los resultados obtenidos en las cuatro amplificaciones.

Prácticamente no se observan variaciones significativas de la acumulación de mensajero *puZ* en las condiciones ensayadas (Figura 4-29). Los mayores niveles de expresión se observan en ausencia de nitrógeno, y los menores en presencia de aminoácidos (prolina, cisterna) y ácido úrico. Los niveles de ARN acumulado de *puZ* en presencia de nitrato ó hipoxantina son similares y se mantienen cuando estas dos fuentes de nitrógeno están presentes en el medio. Esto estaría indicando que el nitrato es una fuente que no induce ni reprime la expresión del gen pero los similares niveles de expresión del nitrato e hipoxantina no permiten descartar que sea una condición inductora (Figura 4-30). Cuando a un cultivo con hipoxantina se le agrega urea, amonio ó prolina, la expresión disminuye con respecto a la obtenida cuando en el medio existe una sola de estas fuentes de nitrógeno (Figura 4-30).



**Figura 4-29: Acumulación de ARNm de *puZ*.** Gráfica del coeficiente R en distintas condiciones: adenina (Ad), xantina (X), hipoxantina (Hx), sin nitrógeno (s/N), amonio (NH4), nitrato (NO3), prolina (Pro), Cisteína (Cys) u urea (ur). R determinados según Pfaffl, con urea como condición calibradora y eficiencias: 0,87 (gen de referencia) y 0,94 (gen de interés).



**Figura 4-30: Determinación de fuente de nitrógeno no inductora-no represora de *puZ*.** Medidas de acumulación de ARNm de *puZ*. Gráfica del coeficiente R en distintas condiciones: amonio (NH4), urea (ur) nitrato (NO3), prolina (Pro) se muestran en gris claro; amonio e hipoxantina, urea e hipoxantina, nitrato e hipoxantina, prolina e hpoxantina se muestran en gris oscuro. R determinados según Pfaffl, con urea como condición calibradora y eficiencias: 0,87 (gen de referencia) y 0,94 (gen de interés).



Los resultados obtenidos indican que ninguna de las condiciones evaluadas induce significativamente *puZ*. La expresión del gen parece alternar entre un estado reprimido y un estado desreprimido en ausencia de fuente de nitrógeno.

### 4.3 Avances en la caracterización de la familia *AzgA-like*

La familia de transportadores de purinas *AzgA-like* a diferencia de lo que ocurre con la familia NAT, está muy poco caracterizada. Recientemente ha sido propuesto que las proteínas de esta familia tienen una estructura similar a las NAT y que los residuos implicados en la unión al sustrato y el transporte serían topológicamente análogos, aunque hasta la fecha sólo ha sido identificada la funcionalidad de 6 residuos del transportador de *A. nidulans* (Kryptou *et al.*, 2014). Identificar la función de mayor número de residuos permitirá contribuir al sustento del modelo propuesto.

Como se indicó anteriormente (sección 4.1.2), el análisis de las proteínas *AzgA-like* de función verificada (incluida PhZ) y las secuencias de proteínas hipotéticas deducidas de genomas secuenciados (29 de procariotas, 35 de plantas, 54 de hongos ascomycotas y 26 de basidiomycotas), nos permitió identificar:

- 34 residuos invariantes: F22 (amino terminal); E41, M52, Y54 y V58 (STM1); T99 (STM2); P117 (*loop* STM1-2); A128 (STM3); R168 (STM4); P176 (Hélice interna); G186, I187 y G188 (STM5); G340 (STM8); D369 y G380 (STM9); E389, S390, G393, G397, G398 (STM10); T400 y G401 (*loop* STM 10-11); F411 y F416 (STM11); P418 y P425 (*loop* STM11-12); A428, L433, V436, G437 y M440 (STM12), G474 y G478 (STM14) (posición según PhZ) (Figura 4-4). Entre éstos se encuentran 2 de los 6 residuos que en *AzgA* han sido identificados como críticos para la función del transportador: E389 y G397 (E394 y G402 en *AzgA*).

- cuatro motivos sumamente conservados que no están presentes en otras familias de transportadores: E-x2-[AG]-[GA]-x-[ATV]-T-[FW]-x-[ATS]-M-X-Y-[IS]-[ILV]-X-V-N, P-X-[AGS]-X-[AG]-[PSC]-[GA]-[MLI]-[GS]-X-[NT]-A-[YF]-X-[AT]-[YF]-X2-V, G-I-G-X-[FY]-[LI]-X3-[GA] y [FY]-[IV]-E-S-X-[AST]-G-X2-[EAV]-G-G-[RKA]-T-G. La mayor diversidad de residuos en estos cuatro motivos se encuentra en secuencias de origen procariota, en las secuencias de hongos y plantas los motivos son aún más conservados (Tabla 4-1).

El análisis de mutantes en los residuos de estos motivos promete contribuir en el establecimiento de las relaciones estructura-función de las proteínas *AzgA-like*. En este sentido para comenzar nos centramos en uno de los motivos que según los predictores de estructura secundaria utilizados quedaba orientado hacia el exterior (motivo 2) y otro orientado hacia el interior celular (motivo 4). Según el modelo tridimensional actual el motivo 2 se encuentra en el STM3, orientado hacia el

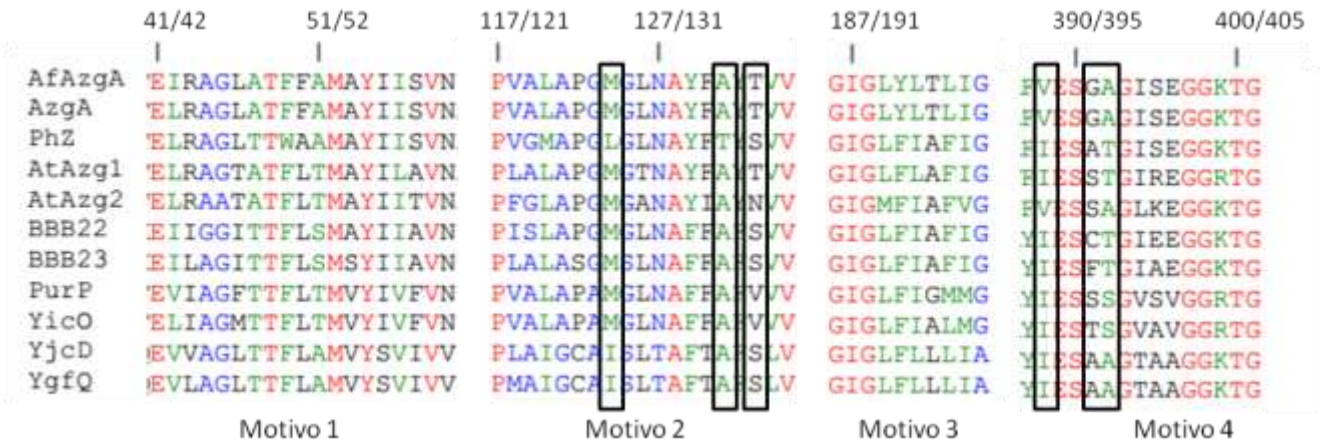
exterior de la célula y el motivo 4 se encuentra en el STM10, orientado hacia el interior (ver Figura 2-10).

Dentro de estos motivos, se descartaron: i) los residuos de mayor variabilidad, ya que probablemente tengan menor incidencia en la estructura y la función; ii) los residuos invariantes y residuos conservados en las secuencias de plantas y hongos, con el objetivo de generar mutaciones de cambio de función (especificidad de sustrato, capacidad de transporte) y minimizar aquellas de pérdida total de función. Entre los restantes, se eligió mutar aquellos residuos que al comparar las secuencias de las proteínas de función conocida, PhZ presenta un aminoácido diferente a los presentes en las secuencias de hongos (AzgA y AfAzgA). Así, PhZ es el único que en el motivo 2 presenta L124, T131 y S133 en lugar de M124 A131 y T133; e I388, A391 y T392 en lugar de V392, G395 y A396 en el motivo 4 (Figura 4-31). Decidimos entonces, sustituir cada uno de estos residuos de PhZ por el correspondiente en sus homólogos (L124M, T131A, S133T, I388V, A391G y T392A).

**Tabla 4-1: Motivos AzgA-like.**

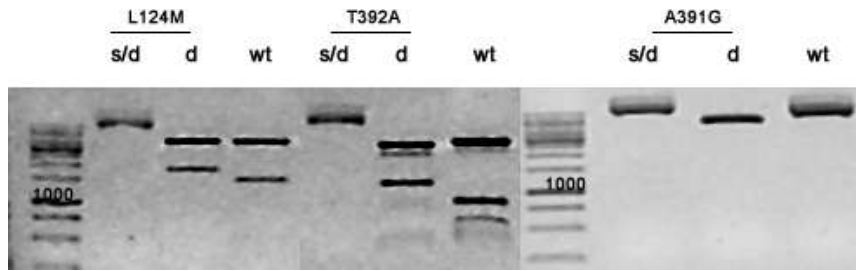
Motivo 1					Motivo 2				
AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.	AA	Asc.	Bas.	Plan.	Proc.
41	E	E	E	E	117	P	P	P	P
42	X	X	X	X	118	V/I/L	V/I	L/F	X
43	R	R	R	X	119	A/G/S	A/G	A/G	A/G/S
44	A/G	A	A	A/G	120	X	L/V/M	L	X
45	G	G	G/A	G	121	A	A	A	A/G
46	X	X	T/A	X	122	P	P	P	P/S/C
47	A/T/V	A/T	A/T	T	123	G	G	G	G/A
48	T	T	T	T	124	M/L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

Se muestra el resultado obtenido del alineamiento mediante ClustalW de las proteínas AzgA-like de función conocida y 144 hipotéticas (para referencia de las secuencias ver sección 7.2.4). La numeración de los aminoácidos marcados se corresponde con la secuencia de PhZ. La X representa cualquier aminoácido.



**Figura 4-31: Motivos AzgA-like.** Alineamiento mediante *ClustalW* de las proteínas AzgA-like de función conocida, se muestran solo los cuatro motivos AzgA-like, las posiciones corresponden a las proteínas PhZ/AzgA. Los recuadros señalan los residuos diferenciales de *phZ* en los motivos 2 y 4 (mutagenizados).

Cada mutación se introdujo en el ADNc de *phZ* clonado (pGemT-*phZ*, sección 4.1.1), mediante mutagénesis sitio dirigida con *primers* diseñados teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones en *A. nidulans* (Iriarte, 2012; Lloyd & Sharp, 1991). Además se diseñaron los *primers* para construir los triples mutantes. L124M-T131A-S133T se generó mediante *primers* con mutaciones dobles utilizando como molde el ADN con la mutación L124M mientras que el mutante I388V-A391G-T392A se generó mediante *primers* que incorporan las 3 mutaciones de una sola vez (Tabla 7-3). Se optimizaron las condiciones de amplificación para disminuir el número de clones con *phZ* wt en el total de clones recuperados. Para 4 de las 8 mutaciones se pudo diseñar un método de *screening* mediante enzimas de restricción que permite discriminar entre los clones que incorporaron la mutación de los que no (Figura 4-32), lo que permitió evaluar un alto número de clones sin necesidad de secuenciar falsos positivos. El corte de la enzima *AvaI* permite diferenciar los mutantes L124M ya que corta en dos sitios el plásmido con la mutación mientras que el plásmido sin mutación es cortado en tres sitios. De esta forma la acción de la enzima genera tres fragmentos en los plásmidos que no incorporaron la mutación (300, 1269 y 3186 pb) y dos fragmentos en los que si tienen la mutación (1569 y 3186 pb). Los clones con T392A y I388V-A391G-T392A se identificaron mediante el corte con *AgeI* y *AvaI*, en los plásmidos con la mutación se generan tres fragmentos (300, 1269 y 3186 pb) mientras que los que no poseen el cambio muestran 4 fragmentos (300, 465, 804 y 3186 pb). Con *KpnI* se evaluaron los clones con A391G ya que la mutación genera el sitio de corte de la enzima que no existe en los clones que no hayan incorporado la mutación, así los plásmidos con la mutación adoptan la conformación lineal mientras que los que no tengan la mutación mantendrán mayoritariamente la conformación circular (Figura 4-32).



**Figura 4-32: Identificación de clones *phZ*-mutantes.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con BrEt de los productos de restricción con *Ava*I (carriles 2 y 4), *Age*I y *Ava*I (carriles 6 y 7) y *Kpn*I (carriles 10 y 11). Wt representa la digestión del plásmidos pgemT-*phZ*, se muestran plásmidos pgemT-*phZ* con la mutación: L124M, T392A y A391G digeridos (d) y sin digerir (s/d). Carriles 1 y 8 marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific.

Se evaluaron 22 clones para las mutaciones L124M y T392A; 13 clones para L124M-T131A-S133T y 6 clones para T131A, S133T, I388V, A391G y I388V-A391G-T392A. Todos los mutantes se verificaron mediante el secuenciado de la totalidad del gen *phZ*. Posteriormente para cada uno de los mutantes se construyeron los *cassettes* 5'*azgA-phZ\_mutante-gfp-riboB*-3'*azgA* mediante el procedimiento previamente desarrollado (sección 4.1.4) y todos fueron verificados por secuencia (pMB03-pMB11 en Tabla 7-2).

La cepa  $\Delta ZAC:: pyrG^+$   $\Delta nku:: argB^+$  *riboB2* *pyroA4* *pabaA1* será transformada con los 8 *cassettes* construidos. Y los transformantes serán evaluados mediante: i) evaluación de auxotrofías, la incorporación del *cassette* complementa el requerimiento de riboflavina pero no de ácido p-aminobenzoico ni piridoxina; ii) amplificación de la totalidad del *cassette* de transformación (aproximadamente 7 kb), a partir del ADN genómico de los aislados. Con los transformantes que presenten el *cassette* se realizarán los estudios de transporte y localización que permitan establecer relaciones estructura-función de la familia *AzgA-like*.

## 5 Discusión y Perspectivas

---

En las bases de datos hay cientos de secuencias homólogas a los transportadores de bases nucleótidas conocidos, en su mayoría proteínas hipotéticas sin rol fisiológico determinado. El análisis comparativo de las características funcionales y de las secuencias o estructuras, permite profundizar en la elucidación de los determinantes estructurales de la función. Este trabajo contribuye en este sentido, caracterizando transportadores de purinas en un filo aún inexplorado. *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens* son organismos basidiomycotas, cuyo hábitat natural es muy limitante en lo que refiere a disponibilidad de nitrógeno. Ambos pueden utilizar purinas como fuente de nitrógeno, presentando diferentes niveles de crecimiento. Estos niveles de crecimiento podrían indicar diferencias en las enzimas del catabolismo, y también podrían ser consecuencia de transportadores específicos con diferente espectro de sustrato, con diferentes afinidades y/o capacidades de transporte.

En el genoma de *P.chrysosporium* encontramos secuencias homólogas a las enzimas del catabolismo de purinas de *A. nidulans* (ver Figura 2-3): adenina desaminasa (Phchr1\_30), xantina dioxigenasa (Phchr1\_40431), urato oxidasa (Phchr1\_41793), alantoína amidohidrolasa (Phchr1\_131247) y alantoato amidohidrolasa (Phchr1\_36224). No se encontró ninguna secuencia con similitud significativa a las purina hidroxilasas I y II, si bien existen secuencias homólogas al cofactor codificado por hxB implicado en modificaciones de purina hidroxilasas (Phchr1\_8389 y Phchr1\_5085). La ausencia de estas enzimas que participan en la oxidación a xantina, estaría de acuerdo con que adenina e hipoxantina sean fuentes de nitrógeno más pobres que xantina o ácido úrico. Adenina e hipoxantina podrían ser metabolizadas por vías alternativas. El crecimiento intermedio observado cuando la fuente de nitrógeno es guanina, concordaría con que en su conversión a xantina no utiliza las mismas enzimas (ver Figura 2-14). Se encuentra un único gen con homología a los de la familia *AzgA-like* (*phZ*), otro tipo NAT (*phU*). En este trabajo se estudió la regulación transcripcional de *phZ* y *phU* y el funcionamiento de las correspondientes proteínas mediante expresión en un sistema heterólogo. Se encuentra un único gen con homología a los de la familia *AzgA-like* (*phZ*) y otro tipo NAT (*phU*).

En hongos y demás microorganismos, la mayor parte de los genes que codifican proteínas involucradas en el catabolismo de fuentes de nitrógeno secundarias, está regulada a nivel de la transcripción en respuesta a dos señales positivas distintas: una señal indicadora global de desrepresión del catabolismo del nitrógeno mediada por factores de regulación generales en ausencia de fuentes primarias y una inducción de los genes que intervienen en una ruta particular debida a la presencia de un sustrato o intermediario específico de la misma.

El gen *phU* sigue este mecanismo de regulación: se induce en presencia de purinas y en condición de carencia de nitrógeno, se reprime en presencia de amonio, urea o aminoácidos (valina, leucina, metionina, cisteína, glicina, alanina, arginina) y, en presencia de nitrato, se transcribe a un nivel basal. La represión por amonio podría estar mediada por la inactivación de un factor general de la transcripción similar a AreA ya que en trabajos anteriores identificamos en el genoma de *P. chrysosporium* dos posibles proteínas reguladoras (Phchr1\_2079 y Phchr1\_43861) con dominios del tipo dedo de zinc (C2C2) junto con sus posibles sitios de unión (motivos WGATAR) en la secuencia promotora. Asimismo, la inducción podría estar mediada por alguna de las dos proteínas (Phchr1\_3510 y Phchr1\_2760) con dominios homólogos a UaY (cluster binuclear de zinc C6Zn2) que fueron identificadas junto con sus posibles blancos de acción (Barraco Vega, 2010; ver sección 2.5).

El gen *phZ* se induce en presencia de adenina o hipoxantina, y se reprime en presencia de urea o aminoácidos. Este resultado unido a la presencia de potenciales sitios de unión de proteínas con dominios del tipo dedo de zinc y cluster binuclear de zinc en la secuencia promotora, indica que la expresión de este gen estaría regulada por los mismos mecanismos que *phU*. Otras fuentes de nitrógeno no parecen tener un efecto significativo sobre su expresión obteniéndose similares cantidades de ARNm acumulado en condiciones de carencia, presencia de amonio, nitrato o ácido úrico. El hecho de que el amonio no tenga un efecto represor significativo, que la ausencia de nitrógeno no aumente el nivel de transcripción y que solo se induzca en presencia de adenina e hipoxantina, lleva a pensar que la expresión de este transportador podría estar además ligada al metabolismo energético. PhZ transporta adenina e hipoxantina (junto con guanina) que son los sustratos de las enzimas de la vía de salvataje de purinas que conduce a la formación de AMP, IMP y GMP respectivamente. Además, estas purinas no son fuentes de nitrógeno eficientes para *P. chrysosporium*, probablemente por la ausencia de enzimas fundamentales como purina hidoxilasas (ver Figura 2-14).

Expresar los transportadores de *P. chrysosporium* en *A. nidulans* permitió trabajar en un contexto conocido. *A. nidulans* además de tener características que favorecen la expresión de secuencias heterólogas y que permiten el desarrollo de numerosas herramientas moleculares para el estudio de transportadores, es el organismo donde se ha estudiado en mayor detalle tanto el catabolismo como el sistema de captación de purinas. De esta forma se contruyó un sistema de trabajo (cepa receptora y sistema de construcción de *cassettes*) en un mismo contexto genético y por tanto metabólico que puede ser utilizado para el estudio de otros transportadores.

La expresión de los transportadores fusionados a la proteína verde fluorescente en *A. nidulans* permitió observar la localización subcelular e incursionar en el estudio de su regulación a nivel post-traducciona, comparándola con la de sus homólogos de este organismo. Los resultados fueron validados mediante el comportamiento de AzgA. Como se esperaba, en presencia de inductor AzgA se localiza en la membrana y en vacuolas y en presencia de represor la cantidad de proteína en vacuolas aumenta notoriamente y no hay transportador asociado a la membrana (Pantazopoulou *et al.*, 2007). En presencia de sustrato tanto PhZ como PhU se localizan en la membrana y en vacuolas y, en presencia de represor no hay transportador asociado a la membrana. Esto indica que las proteínas en estudio responden a los mecanismos de regulación postraducciona del organismo hospedero: endocitosis del transportador en respuesta a amonio y presencia de sustratos. También sugiere que PhZ y PhU seguirían el mecanismo de endocitosis demostrado en UapA donde independientemente de la inducción transcripcional por purinas la presencia de sustrato provoca la endocitosis del transportador que depende de la propia translocación del sustrato (Gournas *et al.*, 2010). Recientemente ha sido demostrado que existen proteínas que cumplen un rol en el tráfico intracelular de algunos transportadores de *A. nidulans*. En el caso de UapA la ubiquitina ligasa (HulA<sup>Rsp5</sup>) que actúa en el residuo de Lys (K572) mediante la acción de la proteína adaptadora tipo arrestina ArtA es necesaria para la ubiquitinación del transportador que induce su endocitosis (Gournas *et al.*, 2010; Karachaliou *et al.*, 2013). Utilizando el predictor de sitios de ubiquitinación BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>) identificamos tanto en PhZ como en PhU además de en AzgA una lisina en el extremo carboxilo terminal con alta probabilidad de ser ubiquitinizada (K576 en PhZ, K591 en PhU y K580 en AzgA), que podrían ser el blanco de acción de la ubiquitina ligasa que marcaría las proteínas transportadoras para su degradación. Además identificamos en el genoma de *P. chrysosporium* una proteína tipo arrestina (Phchr1\_6489) con dos motivos PY (LPxY y xPxY) que podría cumplir la función de proteína adaptadora. Esto lleva a pensar que los transportadores de *P. chrysosporium* se regularían por sus sustratos mediante dos mecanismos antagonistas, inducción transcripcional y aumento de la endocitosis.

PhZ en presencia de sustrato además de localizarse en la membrana y en vacuolas se ubica en anillos citoplasmáticos, que se corresponderían con el retículo endoplasmático (RE), similares a los que se han visto en transportadores: sobre expresados (Pantazopoulou & Diallinas, 2006), en etapas tempranas de la germinación (Vlanti & Diallinas, 2008) o con deficiencias en el plegamiento (Papageorgiou *et al.*, 2008; Amillis *et al.*, 2011). La salida del RE depende no sólo del correcto plegamiento del transportador y motivos de acción *cis*, también depende de factores proteicos con acción *trans* que dirigen los transportadores en vesículas desde el RE al aparato de golgi y luego a la membrana plasmática (Nishimura & Balch, 1997; Fromme & Schekman, 2005;



Diallinas, 2007). Transportadores mal plegados o transportadores que no son del hospedador, usualmente son retenidos en el RE y degradados, pero en el caso de PhZ no hay una retención total en el RE sino que gran parte de la proteína alcanza la membrana. Por esta razón sumado al hecho de que PhU no va al RE es muy poco probable que se trate de la acción de motivos de acción en *cis* o de proteínas de acción *trans* que no coincidan con las de *A. nidulans*. La retención de PhZ en el RE podría deberse a su sobreexpresión, al igual que lo que se observa cuando el transportador FcyB es expresado bajo el promotor de *uapA* que es más fuerte que el de *fcyB* (Vlanti & Diallinas, 2008). Aunque el sistema de expresión utilizado ( $\Delta nkU$ ) tiene muy baja frecuencia de integración no homóloga (Nayak *et al.*, 2006), no es posible descartar que las cepas utilizadas contengan más de una copia de los genes, que provocarían una sobreexpresión del transportador. Para corroborar o descartar esta teoría se deberían analizar las cepas utilizadas mediante *Southern blot*. También hay que considerar que la retención de PhZ en el RE podría deberse a alguna deficiencia en el plegamiento de la proteína que dificulta la llegada del transportador a la membrana. En mutantes de UapA que presentan cierta retención en el RE (pero parte alcanza la membrana) se ha visto que sus afinidades de unión al sustrato son similares a las del transportador silvestre (Pantazopoulou & Diallinas, 2006), por lo que la fracción de PhZ que alcanza la membrana es suficiente para evaluar su funcionalidad y las medidas de cinética del transportador no se verían afectadas.

Una vez verificada la localización en membrana de las proteínas en estudio, nos avocamos al análisis de sustratos. Los resultados obtenidos indican que PhZ y PhU transportan los mismos sustratos que sus análogos de *A. nidulans* (AzgA y UapA) pero presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos. Evaluar el transporte mediante test de crecimiento en competencia con análogos tóxicos es un método fácil de llevar a cabo que tiene la ventaja de no necesitar infraestructura específica como la que se necesita para realizar *uptakes*. Sin embargo tiene la desventaja de ser un método semicuantitativo y a diferencia de los *uptakes* que determinan la afinidad del transportador por su sustrato y la capacidad de transportar del mismo, el análisis por crecimiento brinda una idea acumulativa del transporte en un determinado período de tiempo. Al comparar los resultados obtenidos para AzgA y UapA con lo obtenidos mediante *uptakes* se observan algunas diferencias: mediante *uptakes* se detecta transporte de uridina y 8-azaxantina por AzgA (Cecchetto *et al.*, 2004) pero estos sustratos no fueron detectados mediante el crecimiento en competencia. Esto puede atribuirse a que los *uptakes* fueron realizados con una concentración de competidor hasta 300 veces mayor que la del sustrato marcado, mientras que en los ensayos de crecimiento la máxima concentración de competidor utilizada fue dos veces mayor que la del análogo tóxico. En el caso de UapA la diferencia está en que mediante los ensayos de crecimiento se determinó transporte de: uracilo, hipoxantina, adenina y guanina que según los resultados de *uptakes* no son sustratos de esta proteína (Meintanis *et al.*,

2000). Esta diferencia puede atribuirse a que los *uptakes* se realizaron en competencia con xantina y los test de crecimiento en competencia con oxypurinol. UapA tiene una afinidad mucho mayor por xantina que por oxypurinol, razón por la cual los sustratos pueden desplazar más fácilmente el análogo tóxico que la xantina. Aunque los resultados obtenidos mediante una técnica no son comparables con la otra, los ensayos de crecimiento en competencia con los transportadores de *A. nidulans* permitieron determinar que la eficiencia con la que un sustrato dado desplaza al análogo tóxico es diferente para cada par sustrato-transportador, lo que indica que PhZ y PhU tienen diferencias de funcionamiento (afinidad, capacidad transporte, etc) con AzgA y UapA. PhZ muestra mayor eficiencia con hipoxantina y adenina que con guanina, y es aún menor con 6-tioguanina y 2-aminopurina. Mientras que en AzgA el transporte de adenina es más eficiente que el de hipoxantina y guanina, en menor grado transporta 2-aminopurina y aún con menor eficiencia transporta 6-tioguanina. PhU transporta xantina mejor que uridina y uracilo; menos eficientemente transporta ácido úrico y con menor eficiencia hipoxantina, 2-aminopurina, adenina y guanina. UapA también transporta xantina con la mayor eficiencia detectada pero el transporte de ácido úrico, uridina y uracilo es al mismo nivel, en menor grado transporta 2-aminopurina, hipoxantina, adenina y guanina. Para determinar la afinidad y capacidad de transporte de PhZ y PhU por cada sustrato deberán realizarse los *uptakes* que permitirán determinar las diferencias de transporte con sus homólogos.

Con los resultados de transporte planteamos la hipótesis de que existen residuos clave directamente implicados en la conformación de la estructura y función (especificidad, cinética) de estos transportadores, que explicarían las diferencias observadas entre los transportadores de *P.chrysosporium* y sus homólogos de *A.nidulans*.

El transportador PhU pertenece a la familia NAT ampliamente caracterizada, actualmente se conoce la función y especificidad de cerca de 20 proteínas derivadas de bacterias, hongos, plantas y mamíferos. La secuencia proteica PhU, presenta los 13 residuos invariantes y el motivo característicos de esta familia; y es muy similar a UapA de *A. nidulans* (69% similitud, 50% identidad, cobertura 92%), lo que se traduce en que los predictores les asignen la misma estructura secundaria. Esto permite suponer que estas dos proteínas se ajustan al mismo modelo tridimensional de 14 segmentos transmembrana agrupados en un dominio núcleo compacto y un dominio puerta flexible. Analizando los residuos presentes en las 23 posiciones identificadas como críticas para la función de UapA, se observa que en la mayoría coinciden con los presentes en PhU. Entre éstos se encuentran los cuatro residuos implicados en los contactos con el sustrato xantina: F155, E356, A407 y Q408 (Kosti *et al.*, 2012). PhU difiere solo en cinco de las 23 posiciones analizadas en UapA: Q113/120A, M151/157V, A441/457S, A469/486R y G527/546P (numeración respecto a UapA/PhU, ver Figura 4-3). Los aminoácidos presentes en estas

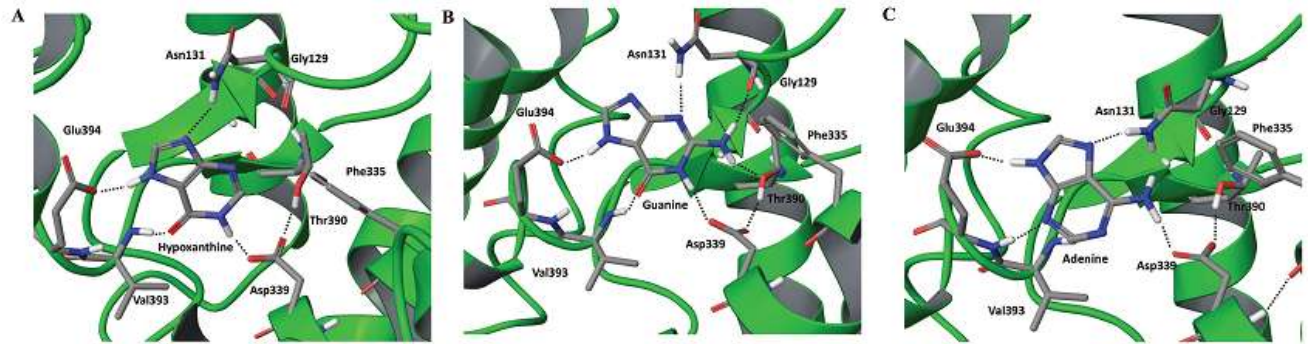
posiciones en la secuencia de PhU están también presentes en otros transportadores NAT: XanQ, YgfU y Lpe1 (A113); YgfU, PyrP y Lpe1 (V151); XanP y SVCT2 (S141); XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG (R469); XanQ y Lpe1 (P527) (numeración respecto a UapA). Se ha visto que sustituciones en los residuos Q113, A441 y A469 (Q113L, A441V y A469E) amplían el rango de especificidad de sustrato, sustituciones de G527 (G527V) afectan la capacidad de transporte de xantina pero no de ácido úrico y sustituciones de M151 (M151V) afectan la afinidad por ácido úrico y xantina (Diallinas *et al.*, 1998; Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010, 2012). En particular las diferencias M151V y G527P podrían relacionarse con las diferencias de transporte de xantina/ácido úrico observadas para estas proteínas: PhU tiene mayor eficiencia en el transporte de xantina que de ácido úrico, mientras que UapA tiene alta capacidad de transporte de ambos sustratos. Debido a que de las sustituciones publicadas solo M151V coincide con el residuo de PhU (V157) nos proponemos realizar el modelo tridimensional de PhU para evaluar si los cambios en estos residuos pueden explicar las hipótesis planteadas, de lo contrario construiremos mutantes en estos residuos.

A diferencia de lo que ocurre con las proteínas de tipo NAT, poco se sabe a nivel de los determinantes estructurales de la función de proteínas *AzgA-like*. En este trabajo identificamos 34 residuos invariantes y cuatro motivos conservados en 144 secuencias (29 de procariotas, 35 de plantas, 54 de hongos ascomycotas y 26 de basidiomycotas). Durante la escritura de este trabajo, Papakostas y colaboradores (2013) describieron la presencia de 45 residuos invariantes y seis motivos conservados, tres de los cuales solapan completamente con los motivos 1, 2 y 4 de este trabajo y otro solapa parcialmente con el motivo 3 (a nivel del submotivo GIG). Es importante destacar que el trabajo de Papakostas y colaboradores se hizo en base a nueve secuencias (7 bacterianas, 2 de plantas y 2 de hongos ascomycotas). La utilización de un mayor número de secuencias y la inclusión de secuencias de hongos basidiomycotas, explican la reducción a nivel de la cantidad de residuos invariantes y de motivos conservados; también explica la menor conservación en cada posición dentro de los motivos aquí presentados.

Asimismo, durante la escritura de esta tesis se publicó un modelo tridimensional del transportador AzgA de *A. nidulans*, construido en base al cristal del transportador de uracilo de *E. coli*, UraA (Kryptou *et al.*, 2014). Los autores proponen que a pesar de que son proteínas funcional y filogenéticamente distintas, y tienen una moderada similitud de secuencia, ésta es suficiente para sustentar el modelo. En el modelo propuesto, AzgA interactúa con sus sustratos fisiológicos (hipoxantina, adenina y guanina) a través de enlaces de hidrógeno formados por las cadenas polares de los residuos N131 (TMS3), D339 (TMS8) y E394 (TMS10) y el grupo amida del esqueleto de V393 (TMS10) que interactúan con N1(H) y C6=O (hipoxantina y guanina), C6-NH2 (adenina) del anillo pirimídico y N7(H) y N9(H) del anillo imidazol. Una red de

enlaces de hidrógeno entre D339-E394-D342 estaría implicada en la unión de protones y la translocación de sustratos. Además el grupo C2-NH<sub>2</sub> en la guanina interactúa con N131 y T390 mediante un doble enlace de hidrógeno y una interacción débil  $\pi$ - $\pi$  (apilamiento) con F392 estabilizaría la unión con hipoxantina y guanina (Figura 5-1). Cuando se introducen cambios en D339N/E/A, D342N/A, T390A y E394Q/A se produce pérdida total o reducción del transporte, mientras que N131D/A se comporta igual al silvestre. Otros dos residuos fueron mutagenizados G129F y G402A observándose pérdida total con el primer cambio y reducción del transporte con el segundo. Los residuos identificados como críticos para la función de los transportadores de *E. coli* PurP y YjcD coinciden con los de AzgA. Debido a que estos residuos se encuentran ubicados en una posición topológica similar a los identificados en las proteínas NAT (UapA y XanQ) los autores concluyen que a pesar de la diferencia de secuencia, los transportadores AzgA-like son estructuralmente similares a los NAT, tienen STMs topológicamente análogas y utilizan similares cadenas de aminoácidos para cumplir con su función. Los mutantes analizados hasta la fecha respaldan la hipótesis planteada, pero es necesario estudiar mayor número de residuos para sustentar que dos grupos de proteínas funcional y evolutivamente distintos como son los transportadores AzgA-like y NAT sean tan similares desde el punto de vista estructural.

Los aminoácidos de las posiciones analizadas en ambos trabajos están absolutamente conservados en PhZ y demás secuencias de hongos y plantas, y altamente conservados en procarionotas. Los seis residuos de PhZ que fueron mutagenizados *in vitro* durante esta tesis L124/128M, T131/135A, S133/137T, I388/393V, A391/396G y T392/397A (numeración PhZ/AzgA), se seleccionaron con el objetivo de generar mutaciones de cambio de función (especificidad de sustrato, capacidad de transporte) y minimizar aquellas de pérdida total de función. Con excepción de I388V (AzgA:V393, PurP:I317), ninguno de los residuos mutagenizados fueron analizados en los trabajos citados. El cambio de I por A en este residuo en PurP (*E. coli*) produce un aumento de la afinidad por adenina y una disminución de la afinidad por purina. A la luz del conocimiento actual, es posible suponer que efectivamente el cambio I388V no generará pérdida total de función pero podría generar un cambio de especificidad debido a que este residuo interactuaría con el sustrato. PhZ y AzgA presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos: Por ejemplo en PhZ el transporte de hipoxantina es más eficiente que el de guanina mientras que AzgA transporta ambas de forma equivalente. Esperamos que los resultados del análisis de estos residuos junto con la estructura tridimensional que construiremos para PhZ aporte a la validación de las hipótesis planteadas así como a priorizar nuevos cambios o combinación de los anteriores.



**Figura 5 -1: Interacciones AzgA-sustrato.** Representación esquemática de la interacción AzgA-hipoxantina en A, AzgA-guanina en B y AzgA-adenina en C. Extraído de Kryptou *et al.*, 2014.

Un trabajo similar se inició con el basidiomycota *P. atropurpurascens*. Debido a que el genoma de este organismo no se encuentra secuenciado, el gen homólogo a *phZ* de *P. crhysosporium* fue clonado mediante la amplificación con *primers* degenerados y RACE PCR obteniéndose la secuencia parcial de un gen (*puZ*), a partir de la cual se deduce una secuencia aminoacídica de 494 residuos. La expresión transcripcional parece alternar entre un estado reprimido y un estado desreprimido en ausencia de fuente de nitrógeno. En el genoma del basidiomycota *Punctularia strigosozonata* que ha quedado recientemente disponible, identificamos la presencia de un gen que presenta muy alta homología con *puZ*, otro con homología a *phU* y enzimas catabólicas hipotéticas: adenina desaminasa (Punst1\_14030), xantina dioxigenasa (Punst1\_117809), urato oxidasa (Punst1\_91772), alantoína amidohidrolasa (Punst1\_123183) y alantoato amidohidrolasa (Punst1\_111899). Al igual que en *P. crhysosporium* no se encontró ninguna secuencia con similitud significativa a las purina hidroxilasas I y II pero si secuencias homólogas al cofactor implicado en modificaciones de purina hidroxilasas. Muy probablemente *P. atropurpurascens* también tenga un gen tipo NAT que no fue identificado con las técnicas empleadas. Con esta información disponible se podrían rediseñar los *primers* degenerados con mayor sesgo en función de las secuencias de *P.strigosozonata*, para completar *puZ* y amplificar el hipotético gen NAT. Dada la similitud de *PuZ* parcial con *PhZ* (84% similitud y 75% identidad) y que el gen *puZ* parece no responder a la presencia de purinas pensamos que profundizar en el estudio de este transportador no es en principio muy prometedor en el sentido de aportar nueva información relevante.

## 6 Conclusiones

---

El presente trabajo constituye la primera caracterización de transportadores de purinas de hongos basidiomycotas.

*Phanerochaete chrysosporium* tiene dos transportadores específicos de purinas, funcionales y regulados. PhZ perteneciente a la familia *AzgA-like*, transporta las purinas más reducidas, adenina, hipoxantina y guanina, y sus análogos 2-aminopurina, 6-tioguanina y 8-azaguanina. La expresión del gen *phZ* estaría ligada tanto al catabolismo como al anabolismo: inducción en presencia de sus sustratos adenina o hipoxantina, represión por presencia de urea o aminoácidos y expresión basal con amonio o carencia de nitrógeno. PhU proteína de la familia NAT, transporta todas las purinas y análogos oxypurinol, uracilo, uridina y 2-aminopurina. El gen *phU* se induce en presencia de purinas y en condición de carencia de nitrógeno y se reprime en presencia de otras fuentes de nitrógeno tales como amonio, urea o aminoácidos. Ambos transportadores se localizan en la membrana en presencia de sustrato y a nivel post-transcripcional responden al mecanismo de endocitosis en respuesta a amonio y sustratos, cuando son expresados en *A. nidulans*. Tanto PhZ como PhU presentan diferencias en los procesos de transporte y/o reconocimiento de sustratos con *AzgA* y *UapA* de *A. nidulans*, respectivamente.

En el basidiomycota *Punctularia atropurpurascens* (cuyo genoma no ha sido secuenciado), se identificó un posible transportador de tipo *AzgA-like*, cuyo gen (*puZ*) muestra los máximos niveles de acumulación de ARNm en ausencia de nitrógeno.

Por último, respecto a la estructura de proteínas *AzgA-like*, se identificaron 34 residuos invariantes y cuatro motivos conservados que caracterizan esta familia de transportadores. Se mutagenizaron *in vitro* seis residuos en dos de estos motivos, generando seis variantes simples y dos variantes triples, cuyo análisis promete contribuir al conocimiento de los determinantes estructurales de la función de los transportadores de esta familia.

## 7 Materiales y Métodos

### 7.1 Materiales

#### 7.1.1 Cepas

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

*Phanerochaete chrysosporium*: 1556, DZM

*Punctularia atropurpurascens*: H2126

*Aspergillus nidulans*: ver Tabla 7-1

**Tabla 7-1: Cepas de *A. nidulans* utilizadas en esta tesis**

Nombre	Genotipo	Origen
MV001	<i>pabaA1 veA1</i>	Dra. Ana Ramón
MV002	<i>riboB2 pyrG89 pyroA4 <math>\Delta</math>kuA::argB</i>	Dra. Ana Ramón
MV053	<i><math>\Delta</math>azgA <math>\Delta</math>uapA::uapA::paba <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> pabaA1 riboB2</i>	Esta tesis. Transformación de MV058 con p520exp
MV058	<i><math>\Delta</math>azgA <math>\Delta</math>uapA <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> pabaA1 riboB2</i>	Dra. Natalie Oestreicher - Dr George Diallinas
MV056	<i><math>\Delta</math>uapA <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> pabaA1 riboB2</i>	Dra. Natalie Oestreicher - Dr George Diallinas
MV059	<i><math>\Delta</math>azgA <math>\Delta</math>uapA <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> argB2 pabaA1</i>	Dra. Natalie Oestreicher - Dr George Diallinas
MV60	<i><math>\Delta</math>azgA <math>\Delta</math>uapA <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> <math>\Delta</math>kuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANU09	<i><math>\Delta</math>azgA::phU::riboB2 <math>\Delta</math>uapA <math>\Delta</math>uapC::pyrG<sup>AF</sup> <math>\Delta</math>kuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento

ANU10	<i>ΔazgA::phU::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANU12	<i>ΔazgA::phU::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANU18	<i>ΔazgA::phU::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANU25	<i>ΔazgA::phU::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANU28	<i>ΔazgA::phU::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANZ03	<i>ΔazgA::phZ::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANZ12	<i>ΔazgA::phZ::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANZ42	<i>ΔazgA::phZ::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANZ56	<i>ΔazgA::phZ::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANZ61	<i>ΔazgA::phZ::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANAZ114	<i>azgA::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANAZ120	<i>azgA::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANAZ121	<i>azgA::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento



ANAZ123	<i>azgA::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento
ANAZ140	<i>azgA::gfp::riboB2 ΔuapAΔuapC::pyrG<sup>AF</sup> ΔnkuA::argB argB? pabaA1 riboB2 pyroA4 pyrG?</i>	Esta tesis. Progenie cruzamiento

#### Descripción de los genotipos

- *pabaA1*: mutación en el gen *pabaA* que codifica la sintasa del ácido para-aminobenzoico, genera auxotrofia por el mismo.
- *pyroA4*: mutación del gen *pyroA* que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de piridoxina (vitamina B6), genera auxotrofia por la piridoxina.
- *riboB2*: mutación en el gen *riboB*, que codifica una enzima necesaria en la biosíntesis de riboflavina (vitamina B2), genera auxotrofia por la riboflavina.
- *pyrG89*: mutación en el gen *pyrG*, que codifica la orotidina 5'-fosfato carboxilasa, genera auxotrofia por la uridina y el uracilo.
- *argB2*: mutación en el gen *argB* que codifica la ornitina carbamil transferasa la cual cataliza la conversión de ornitina en citrulina, un precursor de arginina, genera auxotrofia por la arginina.
- *veA1*: mutación en el gen *veA* que codifica una proteína involucrada en el control de la diferenciación provocando una conidiación más profusa y por lo tanto una mayor facilidad de réplicas.
- *ΔazgA*: deleción en el gen *azgA* que codifica el transportador AzgA, genera deficiencia en el crecimiento en hipoxantina como única fuente de nitrógeno y resistencia a la 8-azaguanina.
- *ΔuapA*: deleción en el gen *uapA* que codifica el transportador UapA, genera deficiencia en el crecimiento en ácido úrico y xantina como única fuente de nitrógeno y resistencia al oxypurinol.
- *ΔuapC::pyrG<sup>AF</sup>* : gen *uapC* que codifica el transportador UapC interrumpido por el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*.
- *ΔnkuA::argB* : gen *nkuA* interrumpido por el gen *argB*. El gen *nku* codifica la subunidad 1 de la helicasa II, implicada en procesos de recombinación heteróloga, la deleción de este gen reduce considerablemente la frecuencia de integración de las secuencias foráneas en otros lugares del genoma y por tanto favorece la recombinación homóloga (Nayak *et al.*, 2006).

- $\Delta azgA::phU::gfp::riboB2$ : es el gen *phU* que codifica el transportador PhU de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $\Delta azgA::phU::riboB2$ : es el gen *phU* que codifica el transportador PhU de *P. chrysosporium* fusionado al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $\Delta azgA::phZ::gfp::riboB2$ : es el gen *phZ* que codifica el transportador PhZ de *P. chrysosporium* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $\Delta azgA::phZ::riboB2$ : es el gen *phZ* que codifica el transportador PhZ de *P. chrysosporium* fusionado al gen *riboB*, integrado en el sitio cromosómico de *azgA*.
- $azgA::gfp::riboB2$ : gen *azgA* fusionado al gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente y al gen *riboB*.

### 7.1.2 Medios de cultivo

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

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

Esterilización por filtración: filtro de 0,25  $\mu$ m.

#### 7.1.2.1 *Aspergillus nidulans*

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

##### **Solución de sales:**

26 g de cloruro de potasio

26 g de sulfato de magnesio heptahidratado

76 g fosfato de potasio monobásico

50 ml de solución de elementos traza

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

##### **Solución de elementos traza:**

40 mg borato de sodio decahidratado

400 mg sulfato de cobre pentahidratado

800 mg fosfato férrico dihidratado

800 mg sulfato de manganeso dihidratado

800 mg molibdato de sodio dihidratado

8 g sulfato de zinc heptahidratado

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

**Solución de casaminoácidos:**

150 g caseína hidrolizada

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

**Solución de vitaminas:**

50 mg de tiamina-HCl

10 mg de biotina

100 mg ácido nicotínico

200 mg pantotenato de calcio

50 mg piridoxina-HCl

100 mg riboflavina

500 mg ácido p-aminobenzóico

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

**Medio mínimo (MM):**

20 ml de solución de sales

10 g de glucosa

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

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

**Medio mínimo sin fosfato (MM-P):**

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

**Medio completo (MC):**

20 ml de solución de sales

10 ml de solución de vitaminas

10 ml de solución de casaminoácidos

10 g de glucosa (dextrosa)

2 g peptona

1 g de extracto de levadura

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

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

**Medio para la regeneración de protoplastos (isosmótico):**

20 ml solución de sales

10 g de glucosa

342.3 g de sacarosa

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

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

**Suplementos para *A. nidulans*:**

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

Fuente de nitrógeno:

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

Suplementos auxotróficos

- Ác. p-aminobenzoico: 20 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Pantotenato de calcio: 20 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Piridoxina HCl: 500 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- L-arginina: 526 mg en 10 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Biotina: 10 mg en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100.
- Riboflavina: 25 mg en 100 ml de agua destilada. Se almacena en oscuridad. Uso 1:100. Se esteriliza por filtración.
- Uridina: se agrega directamente al medio antes de usar (56 mg/100 ml).
- Uracilo: se agrega directamente al medio antes de usar (61 mg/100 ml).

### Análogos de purinas tóxicos

- Oxypurinol: 0.152g en 100 ml de agua destilada. Uso 1:100 Observación: se utiliza con nitrato como fuente de nitrógeno.
- 8- azaguanina: 1g en 100 ml de agua destilada alcalinizada con NaOH. Uso 1:100 Observación: se utiliza con amonio como fuente de nitrógeno (la mitad de la concentración).

### **7.1.2.2 *Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens***

#### **Yeast Carbon Base (YCB):**

11.7 g de YCB (Difco) en un litro de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Observación: debe complementarse con una fuente de nitrógeno.

#### **Agar Malta:**

20 g de extracto de malta y 20 g de agar en un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

#### **Fuentes de nitrógeno:**

- Purinas, tartrato de amonio, urea y nitrato de sodio igual que para *A. nidulans*.
- Aminoácidos: se agregan directamente al medio antes de usar.  
Valina 1,9 mg/ml; leucina 2,1 mg/ml; metionina 2,4 mg/ml; cisteína 1,9 mg/ml; glicina 1,2 mg/ml; alanina 1,4 mg/ml; arginina 0,9 mg/ml y prolina 1,9 mg/ml.

### **7.1.2.3 *Escherichia coli***

#### Medio Luria-Bertani (LB):

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

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

Para seleccionar (por placa): 40 µl X-gal (2%) y 4 µl de IPTG (20%).

#### Medio Luria-Bertani (LB) para células competentes:

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

#### Medio SOB:

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

Medio SOC:

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

### 7.1.3 Plásmidos

Tabla 7-2: Plásmidos utilizados

Nombre	Tamaño (pb)	Descripción	Origen
pGemTeasy	3015	Vector T	Promega
pCR2.1	3900	Vector T	Invitrogen (Life Technologies)
pHL82	6876	PCR2.1::GA5linker-gfp- <i>riboB</i> <sup>AF</sup>	Fungal Genetics Stock Center. (Liu <i>et al.</i> , 2009)
p520exp	10400 aprox.	M13:: <i>uapA</i> :: <i>pabaA</i>	Dr. George Diallinas. (Gournas <i>et al.</i> , 2010)
pPL5	3844 aprox	pUC19:: <i>riboB</i> <sup>AN</sup>	Dra. Gianna Cecchetto. (Oakley <i>et al.</i> , 1987)
pMB01	4800	pGemT:: <i>phUc</i>	Esta tesis
pMB02	4752	pGemT:: <i>phZc</i>	Esta tesis
pMB03	5030	pGemT:: <i>azgA</i>	Esta tesis
p5'azgA	3865	pGemT:: 5' <i>azgA</i>	Esta tesis
p3'azgA	7826	pHL82:: 3' <i>azgA</i>	Esta tesis
pMB04	4752	pGemT:: <i>phZm</i> L124M	Esta tesis

pMB05	4752	pGemT:: <i>phZm</i> T392A	Esta tesis
pMB06	4752	pGemT:: <i>phZm</i> T131A	Esta tesis
pMB07	4752	pGemT:: <i>phZm</i> L124M-T131A-S133T	Esta tesis
pMB08	4752	pGemT:: <i>phZm</i> S133T	Esta tesis
pMB09	4752	pGemT:: <i>phZm</i> I388V	Esta tesis
pMB10	4752	pGemT:: <i>phZm</i> A391G	Esta tesis
pMB11	4752	pGemT:: <i>phZm</i> I388V-A391G-T392A	Esta tesis

c: indica ADN copia, m: indica mutado.

### 7.1.4 Primers

**Tabla 7-3: Primers utilizados**

Nombre	Secuencia	Uso
AN <i>nkU</i> -F1	TCGAACCCCCAGTTGTATTC	<i>nkU</i> para verificación de delección
AN <i>nkU</i> -R1	GAGTGCGAGACGAGTCCTAGA	
AN3 <i>uapC</i> -F1	TCTAGGCTCCCGCATGATAC	<i>uapC</i> para verificación de delección
AN5 <i>uapC</i> -R1	AGAGTCGAGCCAAACAAAGC	
AN <i>pyrG</i> -F2	ATCTCTGCCAGGACCAACAG	Cassette de delección <i>uapC</i>
ANZcF1	ATGGGGTACGCTGAGTGGAT	Gen <i>azgA</i>
ANZcR1	CTATTTCTCCGTGACCTGTTCC	
PhZ-cF1	ATGCCTATCGCCCTCAC	Gen <i>phZ</i>
PhZ-cR1	TCAGTCGTCCTTCTCGGTGAC	
PhU-cF2	ATGTCTGACCACTCGATTGTGA	Gen <i>phU</i>

PhU-cR2	TCAATCCCTGCCTTCTCTTTC	Gen <i>phU</i>
FP1AN5ZF1	TGTAGACCATTCTGATTGATTGAA	P1 en Figura 3-8
AN5ZR1	GCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	5' de <i>azgA</i> con FP1AN5ZF1
FP2AN5ZF2	GTGAGTTTGCGCTAGCAATG	P2 en Figura 3-8
AN3ZF	CCAACGTGACCGGTATAGTATAGA	3' <i>azgA</i> con FP6AN3ZR1
FP6AN3ZR1	TCCCGACCGTTCGTATAGAG	P6 en Figura 3-8
RF3ZpHL82F1	ACGGTGTATGCTCGTCACACTCATCCAACGTGACCGGTATAGTATAGA	Inserción de 3' <i>azgA</i> en <i>pHL82</i>
RF3ZpHL82R1	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCTCCCGACCGTTCGTATAGAG	
FP3-azgA	ATCCACTCAGCGTACCCCATGCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	P3 en Figura 3-8, con <i>azgA</i>
FP3-phZ	GTGAGGGCGATAGGCATGCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	P3 en Figura 3-8, con <i>phZ</i>
FP3-phU	TCACAATCGAGTGGTCAGACATGCTGTCTGTGAGGTCAAATAGG	P3 en Figura 3-8, con <i>phU</i>
FP5AN3ZR2	ATGGTTTGGCATTCTCTTGG	P5 en Figura 3-8
FP4GFPazgA1	AGGAACAGGTCACGGAGAAAGGAGCTGGTGCAGGCG	P4 en Figura 3-8, con <i>azgA</i>
FP4GFPphZ1	GGTCACCGAGAAGGACGACGGAGCTGGTGCAGGCG	P4 en Figura 3-8, con <i>phZ</i>
FP4GFPphU1	TGAGAAAGAGAAGGACAGGGATGGAGCTGGTGCAGGCG	P4 en Figura 3-8, con <i>phU</i>
FP4RbazgA	GGAACAGGTCACGGAGAAATAGGCCTCAAACAATGCTCTTCA	Idem FP4GFPazgA1, para construcción de <i>cassette</i> sin GFP
FP4RbphZ	GTCACCGAGAAGGACGACTGAGCCTCAAACAATGCTCTTCA	Idem FP4GFPphZ1, para construcción de <i>cassette</i> sin GFP
FP4RbphU	GAAAGAGAAGGACAGGGATTGAGCCTCAAACAATGCTCTTCA	Idem FP4GFPphU1, para construcción de <i>cassette</i> sin GFP
AN5Zseq-F1	ATGCGCCTCGATCGTTG	Secuenciado transformantes <i>A. nidulans</i> con <i>cassette</i>
AN5Zseq-F2	TGTGAGCTTCTGGAATGTCG	
ANgfpseq-R1	ACCTTCACCCCTCTCCACTGA	



Rib82seq-R2	CTGTTGCCAGGTGAGGGTAT	Secuenciado transformantes <i>A. nidulans</i> con cassette
Rib82seq-F3	CCATTTGCTCCAATGAACCT	
Phgpd-qF2 (*1)	TACCACCGCTACCCAGAAGA	<i>gpd P. chrysosporium</i> en qPCR
Phgpd-qR2 (*1)	GACGAGGGGATGATGTTGTT	
PhZ-qF2 (*2)	ATCCTCGACACGACTGGAAC	<i>phZ</i> en qPCR
PhZ-qR2 (*2)	TGACGCTCGACTTTGAGAAC	
PhU-qF7 (*2)	GCTGCATGTTCTCATCCTC	<i>phU</i> en qPCR
PhU-qR5 (*2)	GAATCCCGTCCTTGGTGG	
pugpd-qF (*1)	CGCTGAGTACATCGTCGAGTC	<i>gpd P. atropurpurascens</i> en qPCR
pugpd-qR (*1)	CGGAGATGATGACCTTCTTGG	
puZ-qF6	CTCGATTTGAGAGGAGCAC	<i>puZ</i> en qPCR y RACE <i>puZ</i> '
puZ-qR6	TCTCGATGAAAGCCGTAC	
(dT)17-adaptor (*3)	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	Síntesis de ADNc para RACE 3'
AdaptadorR (*3)	GACTCGAGTCGACATCG	RACE 3' <i>puZ</i>
puZ-qF16	TGTGACGGCTTTCATCGAG	
puZ-R17	TCGCAATAGCCAGAGAGTT	RACE 5' <i>puZ</i>
puZ-R18	CAGGAGCGACAATATGACGA	
pD2_LM_F1	ATGGCGCCCGGAaTgGGGTTGAACGCATAC	Mutación L124M
pD2_LM_R1	TATGCGTTCAACCCcAtTCCGGGCGCCATG	
pD2_TA_F2	AACGCATACTTCgCcTACTCGGTTGTTGGTTCCAC	Mutación T131A
pD2_TA_R2	TGGAAACCAACAACCGAGTAcGcGAAGTATGCGTTC	
pD2_ST_F3	GTTGAACGCATACTTCACATACaCtGTTGTTGGTTCCAC	Mutación S133T
pD2_ST_R3	GTGGAAACCAACAACaGtGTATGTGAAGTATGCGTTCAAC	
pD2_TA_ST_F4	TTGAACGCATACTTCgCcTACaCtGTTGTTGGTTCCACG	Mutaciones L124M-T131A-S133T

pD2_TA_ST_R4	TGGAAACCAACAACAGTGTAgGcGAAGTATGCGTTCAACC	Mutaciones L124M-T131A- S133T
pD4_IV_F5	TGTCACCGCGTTCgTCGAGTCCGCG	Mutación I388V
pD4_IV_R5	GGACTCGAcGAACGCGGTGACAGGG	
pD4_AG_F6	GTTCATCGAGTCCGgtACCGGTATCTCCGAG	Mutación A391G
pD4_AG_R6	TCGGAGATACCGGTACCGGACTCGATGAACG	
pD4_TA_F7	ATCGAGTCCGCGgCCGGTATCTCCG	Mutación T392A
pD4_TA_R7	GGAGATACCGGcCGCGGACTCGATG	
pD4_IV_AG_TA_F8	ACCGCGTTCgTCGAGTCCGgtgCCGGTATCTCCGA	Mutaciones I388V-A391G- T392A
pD4_IV_AG_TA_R8	TCGGAGATACCGGcAcCGGACTCGAcGAACGCGGT	
pCR21_ampF1	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Verificación de insertos en pCR2.1 y pGemTeasy
pCR21_ampR1	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	
pCR21_seqF1	GGATAACAATTTACACAGG	Secuenciación de insertos en pCR2.1 y pGemTeasy
pCR21_seqR1	GGCGATTAAGTTGGGTAAC	

Todos los *primers* fueron diseñados en esta tesis a excepción de los marcados con \*: \*1(Ibáñez, 2010), \*2(Barraco Vega, 2010) y \*3(Frohman *et al.*, 1988). Todos fueron sintetizados por MacroGen Korea. En los *primers* utilizados para mutagénesis con letra minúscula se indica el cambio introducido.

## 7.2 Métodos

### 7.2.1 Técnicas empleadas con *A. nidulans*

#### 7.2.1.1 Análisis de crecimiento en placa

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

### **7.2.1.2 Obtención de cultivo monospórico (siembra por suspensión de esporas)**

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

### **7.2.1.3 Cruzamiento de cepas**

Se inocula una placa de medio mínimo 1,3% agar (amonio y suplementos) con ambos parentales (4 inoculaciones de cada uno), cada uno enfrentado a una distancia de aproximadamente 2 cm con el otro. Se incuba a 37°C hasta que las colonias se toquen (48-72 hs). Se extrae con un ansa un cilindro de la zona interparental (en lo posible sin conidias) y se transfiere a una placa de 6 cm con medio mínimo (hasta el borde) con nitrato como fuente de nitrógeno y sin suplementos (si los parentales coincidan en alguna auxotrofía el medio se suplementa para ese carácter). Se incuba a 37°C por 48-72 hs. Se sella la placa con cinta adhesiva para evitar intercambio gaseoso y se incuba 10-20 días a 37°C. Luego bajo lupa se levantan varios cleistotecios tocando con punta diferentes lugares de la placa, cada cleistotecio se limpia bajo lupa haciéndolos rodar sobre una placa de petri con agar 3%, hasta que se ve la superficie oscura y brillante. Cada cleistotecio limpio se transfiere a un eppendorf con 30-40 µl de Tween 80 (0,01%) y se “explotan” con punta amarilla (para romper la pared y liberar las ascosporas). Se agrega 1 ml de Tween 80 (0,01%) y se homogeneiza por vortex. Para identificar los cleistotecios cruzados se siembra una placa con medio mínimo con fuente de nitrógeno y sin suplementos (excepto las auxotrofías que están en ambos parentales) se incuba y el crecimiento de colonias indica segregación de caracteres.

Se selecciona un cleistotecio cruzado y se plaquean 100 µl de diluciones 1/10 y 1/100 de la suspensión de ascosporas. Las placas pueden ser de medio completo ó medio mínimo si se quiere seleccionar una parte de la progenie. Para la selección de la cepa receptora de esta tesis se utilizó medio mínimo suplementado con amonio, 8-azaguanina, ácido p-aminobenzoico, piridoxina y riboflavina. Se incuba a 37°C por 48 hs. Las colonias aisladas se analizan mediante análisis de crecimiento en placa.

### **7.2.1.4 Cultivo en medio líquido**

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

### 7.2.1.5 Transformación de *A. nidulans*

Se siguió el protocolo descrito en Nayak *et al.*, 2006 con algunas modificaciones.

#### Producción de protoplastos

Se inoculan 400 ml de medio mínimo y los suplementos correspondientes con una suspensión de conidias (2 placas confluentes en 15 ml de Tween 80 (0,01%)). Se incuba a 25°C y 140 rpm durante 11-12 horas, se sigue el cultivo al microscopio y se detiene cuando las esporas comienzan a germinar. El micelio se filtra a través de blutex, se lava con agua estéril y se seca entre hojas de papel estériles. El micelio seco se pesa por diferencia en un falcon estéril y se resuspende en solución B (10 ml/g de micelio), se homogeneiza por vortex y se transfiere a un matraz estéril agregando por cada gramo de micelio 3-7 mg de albúmina de suero bovino (BSA) y 300-400 mg Glucanex o 150 mg de Vinoflow de Novozyme (Esta última fue la elegida por presentar mayor eficiencia de protoplastización). Se incuba durante 1-2 horas a 30°C y 100 rpm, siguiendo la formación de protoplastos al microscopio. La suspensión de protoplastos se transfiere a tubos corex estériles se homogeneiza por vortex suavemente y se le agrega lentamente por la pared del tubo un volumen igual de solución D. Los tubos deben mantenerse en hielo y se debe observar la formación de 2 capas. Se centrifuga 10 min. a 6000 rpm a 14°C. Los protoplastos forman una capa blanca en la interfase que se transfiere con pipeta Pasteur a otro tubo corex estéril, se lava agregando 5 ml de solución E y se centrifuga 10 min. a 4000 rpm. Los protoplastos se resuspenden en 5 ml de solución G para realizar el recuento en cámara de Neubauer. Se centrifugan 10 min. a 4000 rpm y se resuspende la cantidad de solución G necesaria para obtener una concentración de  $2-5 \times 10^7$  protoplastos/100  $\mu$ L.

#### Transformación

A 100  $\mu$ L se le agrega 250 ng de ADN (volumen menor a 15  $\mu$ l). Se homogeneiza por vortex 6-8 veces por 1 segundo a máxima velocidad y se agrega 50  $\mu$ l de solución de PEG (recién filtrada) se homogeneiza por vortex 3-4 veces por 1 segundo a máxima velocidad y se deja en hielo durante 25 minutos. Luego se agrega 1 ml de solución PEG, se mezcla con micropipeta por lo menos 10 veces y se deja a temperatura ambiente durante 25 minutos. El volumen total de transformación se plaquea (150  $\mu$ l/placa) en medio mínimo 1M de sacarosa con los suplementos adecuados. Se incuba a 37° hasta la visualización de colonias (3-5 días).

#### Soluciones de transformación:

B:1.2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM ortofosfato (se ajusta el pH a 5.8). Se esteriliza por filtración.

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

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

G: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>.

PEG: 0.6 M KCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 75 mM polietilenglicol (= 25% w/v). Se filtra antes de usar. Las soluciones D, E, G y PEG se esterilizan por calor húmedo.

### **7.2.1.6 Microscopía de fluorescencia**

Las cepas a observar se crecen sobre la superficie de un cubreobjetos. Se utilizan cubreobjetos de vidrio redondo de 14mm de diámetro (esterilizados mediante flameado) que son colocados en placas de 12 pocillos. A cada pocillo se le agrega 3 ml de medio mínimo sin fosfato (MM-P), con 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, los suplementos correspondientes y la fuente de nitrógeno elegida. Cada pocillo se inoculó con 10 µL de una suspensión en Tween 80 (0,01%) de la cepa de interés de 10<sup>6</sup> esporas/ml y se incubó a 28°C durante 14 horas. Para la observación, el exceso de medio del cubreobjetos se escurre sobre una servilleta y se dispone sobre un portaobjetos. Para los estudios con el colorante vacuolar se siguió el protocolo recomendado por Manuel Sanguinetti (comunicación personal): previo a la observación los cultivos crecidos sobre el cubreobjetos son tratados con CMAC (7-amino-4-chloromethyl coumarin, Molecular Probes, Invitrogen). Se extrae el cubreobjeto y se incuba con 100 µL de una dilución 1:1000 de CMAC en agua destilada (solución Stock 5 mg/ml en DMSO) a 25 °C por 20 minutos en oscuridad. Luego se agrega medio de cultivo fresco (3 ml) para lavar el exceso de CMAC y se incuba por otros 20 minutos

Las muestras se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i, equipado con un filtro B-2E/C (Nikon) para visualizar la fluorescencia emitida por GFP y un filtro B-2A para visualizar la fluorescencia emitida por CMAC. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital DS-Fi1 (Nikon) y se utilizaron los programas de obtención y tratamiento de imágenes NIS- Elements F3.0 y Adobe Fireworks CS4

## **7.2.2 Técnicas empleadas con *P. chrysosporium* y *P. atropurpurascens***

### **7.2.2.1 Obtención de cultivo monospórico**

Igual que con *A. nidulans* pero para *P. chrysosporium* la placa se incuba 7 días a 28°C y para *P. atropurpurascens* se incuba 5 días a 28°C.

### **7.2.2.2 Cultivo en medio líquido para estudios de expresión génica**

A partir de tantas placas como condiciones a estudiar se recolectan las conidias en Tween 80 (0,01%), se filtra la suspensión a través de blutex, se homogeneiza por vortex y se inocula con la suspensión ( $10^5$  esporas) 100 ml de medio mínimo (YCB) con urea. Se incuba a 28° 150 rpm 87 horas en el caso de *P. chrysosporium* y 7 días en el caso de *P. atropurpurascens*. El micelio obtenido se filtra a través de blutex, se lava con agua destilada estéril, se vuelve rápidamente al erlenmeyer agregando nuevo medio, la condición a estudiar (fuente de nitrógeno). Se reincuba a 28° 150 rpm 6 días en el caso de *P. chrysosporium* y 2 días en el caso de *P. atropurpurascens*. Se filtra el micelio obtenido a través de blutex, se enjuaga con agua destilada estéril, se escurre y se seca entre papeles estériles, se envuelve en papel de aluminio y se guarda a -70°C.

### **7.2.3 Técnicas empleadas con ácidos nucleicos**

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

#### **7.2.3.1 Preparación de las muestras para aislamiento de ácidos nucleicos.**

Se tritura el micelio en mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta formar un polvo fino, se alícuota (50-100 mg) en eppendorf de 2 ml y se guarda a -70°C o se continua con el protocolo de extracción.

#### **7.2.3.2 Extracción de ADN genómico de hongos**

A cada eppendorf con micelio pulverizado se le agregan 900 µl de buffer de extracción, se homogeneiza por vortex y se incuba 5-10 minutos en hielo. Posteriormente se adiciona 1 volumen de fenol: cloroformo:isoamílico (25:24:1), se homogeneiza por vortex y se centrifuga durante 5 minutos a 12000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se agrega 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1), se homogeneiza por vortex, se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm y se recupera la fase acuosa. La precipitación se realiza con 1/10 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de EtOH 95% durante 20 minutos en hielo. Se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, se lava el pellet con EtOH 70%, se resuspende en 50-100 µl de TE-ARNasa y se incuba durante 30 minutos a 37°C.

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

TE-ARNasa: 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH7.6 y 1 mM de EDTA pH8) y 10 µl ARNasa (10 mg/ml).

### 7.2.3.3 Extracción de ARN total

Se realizó el protocolo recomendado por el fabricante del reactivo de TRIzol (Invitrogen) con algunas modificaciones. Se agrega a cada eppendorf con micelio pulverizado 1 ml de TRIzol. Se mezcla bien y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 0.2 ml de cloroformo, se agitan los tubos por inversión durante 15 segundos y se incuban 2-3 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos a 2-8°C. Se transfiere la fase acuosa a un eppendorff de 1.5 ml, se agregan 0.5 ml de isopropanol y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 minutos a 10.000rpm a 2-8°C para posteriormente remover el sobrenadante. Se lava el ARN con 1 ml EtOH 75%, se homogeneiza por vortex y se centrifuga a 6500 rpm durante 5 minutos a 2-8 °C. El pellet de ARN obtenido se seca brevemente en hielo y se disuelve en 50-100 µl de agua DEPC, agitándolo a mano y dejándolo unos minutos en hielo. El ARN obtenido se almacena a -70°C.

Agua DEPC: 200 µl de solución comercial de DEPC (USB™) en 1L de agua destilada se deja actuar 8-12 hs noche en campana y se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

### 7.2.3.4 Extracción de ADN plasmídico

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

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

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

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

Solución III: 60 ml de KAc 5M, 11,5 ml de HAc glacial y 28,5 ml de H<sub>2</sub>O. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

### 7.2.3.5 Amplificación mediante PCR convencional

Las amplificaciones para detección de deleciones (*Δnku* y *ΔuapC*) y verificación de clones con inserto se realizaron con la enzima Taq Pol (Invitrogen) en un volumen final de 25 μl con: 2,5 μl de buffer de Taq Pol, 1 μl de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 μl de dNTPs (10 mM) (Promega), 1,5 μl de cada primer (10 μM), 0,25 μl de Taq Pol y 10-100 ng de ADN. Se utilizó un programa de: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 2-5 minutos\* a 72°C, y por último 5 minutos a 72°C

Las amplificaciones de genes (completos) y amplificaciones para Fusión PCR y verificación de *cassette* se realizaron con la enzima Hi Fidelity (Thermo Scientific) en un volumen final de 50 μl con: 5 μl de buffer de enzima, 2 μl de MgCl<sub>2</sub>, 5 μl de dNTPs (10 mM) (Promega), 2,5 μl de cada primer (10 μM), 0,5 μl de enzima y 10-100 ng de ADN. Para las amplificaciones de *phZ* y *azgA* se agregó 5 μl de DMSO (Sigma).

El programa utilizado involucra una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, y 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50-58°C (según el caso) y 2-3 minutos a 72°C (según el caso), por último 5 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación utilizada fue: 52°C (*phZ* y *azgA*), 50°C (*phU*), 57°C (5' de *azgA*) y 58°C (3' de *azgA*). El tiempo de extensión fue: 2 minutos (5' *azgA* y 3' de *azgA*), 2 minutos y medio (*phZ* y *phU*) y 3 minutos (*azgA*). Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en termociclador Corbett (CG1-96). Para verificación de *cassette* en las cepas se utilizó el mismo programa que para Fusión por PCR.

### 7.2.3.6 PCR para fusión

Los *cassettes* 5' *azgA*-transportador-*gfp-ribo*-3' *azgA* y 5' *azgA*-transportador-*gfp-ribo*-3' *azgA* (ver Figura 4-8) se construyeron mediante el protocolo descrito por Szewczyk *et al.*, 2007 con algunas modificaciones.

Tanto para amplificar los componentes del *cassette* como para fusionarlos se utilizó la enzima Hi Fidelity (Thermo Scientific) en un volumen final de 50 μl, con los mismos componentes de reacción que los descritos para PCR convencional con esta enzima.

Para amplificar los componentes se utilizó el programa descrito en PCR convencional a excepción de la amplificación de *gfp-ribo*-3' de *azgA* y *ribo*-3' de *azgA* para lo cual se utilizó un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, luego 10 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 6 minutos a 72°C, seguidos de 15 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 6 minutos más 20 segundos en cada ciclo a 72°C, por último una extensión final de 7 minutos a 72°C. Para fusionar los componente del *cassette* se utilizó el mismo

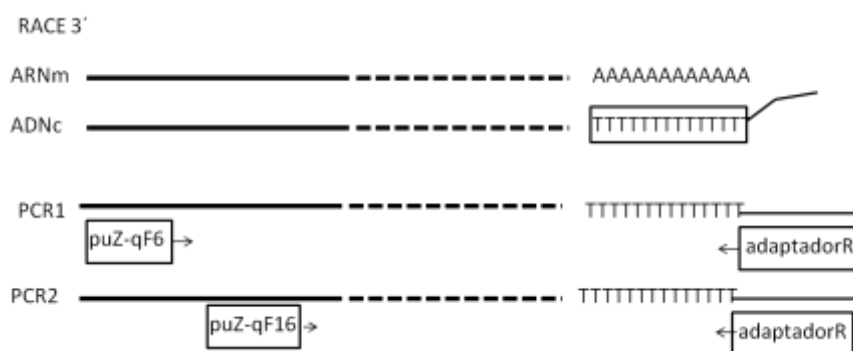


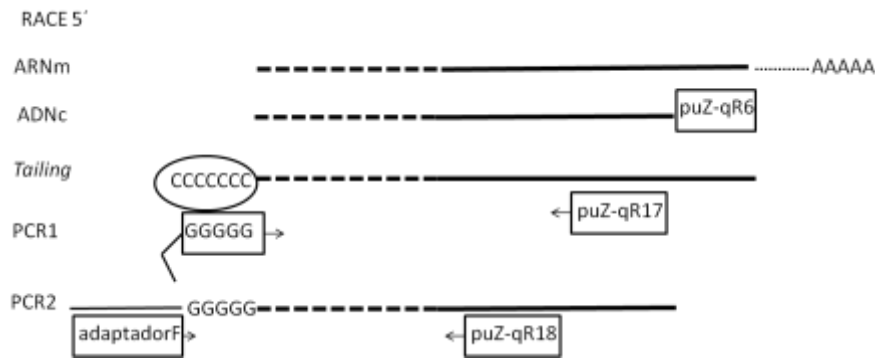
programa pero con 8 minutos de extensión. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en termociclador Corbett (CG1-96) y fueron purificadas mediante *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

### 7.2.3.7 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

Para completar el clonado del gen *puZ* se utilizó la técnica de RACE (Yeku & Frohman, 2011).

Para amplificar el extremo 3´se utilizó el protocolo descrito en Frohman *et al.*, 1988 con algunas modificaciones. El ADNc se sintetiza con el mismo protocolo descrito en reacción de RT-PCR para el clonado de genes (ver 7.2.3.10) pero utilizando 1 µl (50µM) del *primer* oligodT (con la cola adaptadora, ver Tabla7-3) . El ADNc obtenido (2 µl) se amplificó con puZ-qF6 y el adaptador mediante la enzima Hi Fidelity (Thermo Scientific) en las mismas condiciones descritas para PCR convencional (ver sección 7.2.3.5), utilizando una temperatura de hibridación de 55°C y un tiempo de extensión de 1 minuto y medio. El producto obtenido (1 µl) se amplificó en una segunda ronda con el mismo *primer* reverso (adaptador) y puZ-qF16, en las mismas condiciones que la amplificación anterior .Para amplificar el extremo 5´se utilizó el protocolo descrito por el fabricante del kit *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0* (Life Technologies). El ADNc se sintetiza con un *primer* específico (puZ-qR6). Al ADNc obtenido se le adicionan citosinas en el extremo 5´mediante una una transferasa terminal de desoxinucleótidos. Posteriormente se amplifica con un *primer* oligodG que hibrida (con cola adaptadora) y un *primer* reverso específico (puZ-qR17). El producto obtenido se amplifica en una segunda ronda con un primer que hibrida con la secuencia adaptadora y un *primer* reverso específico más interno (puZ-qR18). Ver tabla Tabla 7-3 y Figura 7-1.





**Figura 7-1:** Esquema de la amplificación de *puZ* mediante RACE PCR. Las Líneas cortadas representan la secuencia desconocida y las enteras la conocida.

### 7.2.3.8 Amplificación mediante PCR en tiempo real

Los ensayos de qRT-PCR se realizaron utilizando QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Qiagen) en un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l conteniendo 0,5  $\mu$ l de cada primer (6  $\mu$ M) y 2  $\mu$ l de molde ya sea ADNg (5 ng/ $\mu$ l) o ADNc (dilución  $\frac{1}{4}$  del total sintetizado). Las amplificaciones se llevaron a cabo (termociclador Corbett Rotor Gene<sup>TM</sup> 6000) utilizando un programa con una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos y luego 30 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización) y un minuto a 59°C (hibridación-extensión). Las reacciones se realizaron por duplicado o triplicado.

### 7.2.3.9 Purificación de productos de PCR

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

### 7.2.3.10 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó con algunas modificaciones del protocolo recomendado por el fabricante de la DNAsa y la transcriptasa reversa (Invitrogen). La eliminación del ADN presente se realiza en un volumen de reacción de 9,4  $\mu$ l con 1  $\mu$ l de buffer 10x, 0,4  $\mu$ l de DNAsa (Invitrogen), 1  $\mu$ g de ARN y agua DEPC. La enzima se deja actuar durante 17 minutos hasta la preinactivación con 1  $\mu$ l de EDTA. Finalmente la inactivación se realiza durante 10 minutos a 65°C. La reacción de RT-PCR para utilizar en qPCR se realizó en un volumen final de 20,4  $\mu$ l. Se agregaron 4  $\mu$ l de buffer 5x, 2  $\mu$ l dTT (Invitrogen), 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM c/u), 1  $\mu$ l random *primers* (0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Qiagen), 1  $\mu$ l inhibidor de RNAsa y 1  $\mu$ l MMLV (200U/ $\mu$ l) (Invitrogen) a los 10,4  $\mu$ l resultantes del tratamiento con ADNasa. Para llevar a cabo la reacción se utilizó un programa de 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C. Una vez obtenidos los ADNc se diluyeron al cuarto y se almacenaron a -20°C. La reacción de RT-PCR para el clonado de *phZc* y

*phUc* se realizó con *primers* específicos. A los 10,4 µl de la muestra tratada con ADNasa se le agregó 1 pmol de cada *primer* específico y 1 µl de dNTPs 10 mM c/u (Promega), la mezcla se incubó por 5 minutos a 65°C y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se le adicionaron 4 µl buffer 5x, 2 µl dTT (0.1M) y 1 µl de RNasa OUT (40 U/µl) y se incubó durante 2 minutos a 37°C, por último se agregó 1µl MMLV (200U) se incubó durante 50 minutos a 37 °C y luego 15 minutos a 70°C. Al ADNc sintetizado se le agregó 2 unidades de ARNasa H (Fermentas) y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Luego de la eliminación del ARN el ADNc puede ser clonado.

#### **7.2.3.11 Electroforesis de ADN**

Para visualizar ADN genómico, plasmídico y productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % o 2,5% (según tamaño del producto) en buffer TBE 0,5x con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las muestras se sembraron con ayuda del buffer de carga 5x. La corrida se realizó a 100-150 V durante 20-60 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific o 100pb DNA Ladder Thermo Scientific

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

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

#### **7.2.3.12 Electroforesis de ARN**

El ARN se visualizó mediante electroforesis en agarosa 0,8% en buffer TBE 0,5x preparado con agua DEPC. Se sembraron 2 µl de ARN con 3 µl de buffer de carga y se migraron durante 10 minutos a 125 V.

Buffer de carga: 80 µl de Buffer NaPO<sub>4</sub> (100 mM), 100 µl de azul de carga, 25 µl de EtBr (10 mg/ml), 500 µl de glicerol y 295 µl de H<sub>2</sub>O

Azul de carga: 1 ml de Buffer NaPO<sub>4</sub> 100 mM, 5 ml de glicerol, 0,025 g de azul de bromofenol, 0,025 g de Xilenxianol y 4 ml de H<sub>2</sub>O.

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

#### **7.2.3.13 Clonado en vector T**

Los productos de PCR se corren en un gel de agarosa para escindir las bandas y purificarlas. Para llevar a cabo la purificación mediante minicolumnas Wisard (Promega), las bandas se cortan en trozos y se introducen en las columnas, se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Posteriormente se realiza la precipitación con 1/10 de volumen de NaAc y 2 volúmenes de EtOH absoluto durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifuga durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 13000 rpm, se lava con 1 ml EtOH 70 y se centrifuga 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 13000 rpm. El pellet se seca y se resuspende en 10-20  $\mu\text{l}$  de agua mQ. El clonado en los vector pCR 2.1 (Invitrogen) y pGemTeasy (Promega) se llevaron a cabo según las recomendaciones de los fabricantes. Los productos de ligación se precipitaron con ARN-t y se transformaron células TOP10 de *E. coli* mediante electroporación.

### **Precipitación de los productos de ligación con ARN-t**

La mezcla de precipitación se realiza con 5  $\mu\text{l}$  del producto de ligación, 5  $\mu\text{l}$  de ARN-t (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Invitrogen), 10 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O mQ y 50 $\mu\text{l}$  de EtOH absoluto. Se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet se lava con 100  $\mu\text{l}$  de EtOH 70% y se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se deja secar y se resuspende en 2  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O mQ (Zhu & Dean, 1999).

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

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

### **Preparación de células electrocompetentes**

Para la preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* Top 10 se realiza un precultivo en 3 ml de LB que se incuba toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Con 1 ml de precultivo se inoculan 250 ml de LB y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  a 300 rpm donde se dejan crecer las células hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se transfiere el cultivo a tubos de centrifuga y se deja en hielo durante 20 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 4000 g, se elimina todo el sobrenadante, se resuspende en 1 volumen de glicerol 10% y se centrifuga en las mismas condiciones. Se resuspende en 1/2 volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar. Posteriormente se resuspende en 1/25 volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Por último se resuspenden en 1 ml de glicerol 10%. Se alicuotan 50  $\mu\text{l}$  de las células en eppendorf, se congelan en N<sub>2</sub> líquido y se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La evaluación de las células competentes se realiza mediante electroporación con 10 pg del plásmido pUC19, se debe obtener una eficiencia de transformación igual o mayor de  $10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de vector electroporado.

#### **7.2.3.14 Clonado sin enzimas de restricción (RF-PCR)**

Para clonar la secuencia de 3' *azgA* en el plásmido pHL82 se sigue el protocolo descrito por Van den Ent & Lowe, 2006 con algunas modificaciones.

Se amplificó 3' de *azgA* con los *primers* diseñados para este fin (RF3ZpHL82F1 y RF3ZpHL82R1) utilizando la enzima Hi Fidelity (Thermo Scientific) en las condiciones descritas para PCR convencional (Ver sección 7.2.3.5). El producto obtenido se purificó mediante *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) (ver 7.2.3.9) y la inserción se realizó mediante una amplificación con Hi Fidelity (Thermo Scientific) en un volumen final de 50 µl con: 5 µl de buffer de enzima, 5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de dNTPs (10 mM) (Promega), 0,5 µl de enzima, 200 ng del producto amplificado anteriormente (3' de *azgA*) y 200 ng de vector pHL82. Se utilizó un programa de 30 segundos a 94°C y 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 7 minutos y medio a 72°C, por último 7 minutos a 72°C. Para eliminar la hebra parental del plásmido el producto obtenido se trató con DpnI (Fermentas) en un volumen de reacción de 20 µl se agregaron: 2 µl de buffer Tango (10x), 10 µl del producto amplificado y 2 µl de enzima (20 unidades) se incubó a 37°C durante 2 horas. El volumen total de digestión se dializó para eliminar sales y se transformó células TOP10 de *E. coli* según el protocolo descrito en 7.2.3.13.

#### **7.2.3.15 Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción**

La elección de las enzimas de restricción se realizó analizando las secuencias con los programas Webcutter2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) y NEBcutter V2.0 (New England Biolabs, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). La digestión de los plásmidos (500 ng aproximadamente) se realizó en un volumen final de 20 µl empleando las recomendaciones del fabricante de las enzimas utilizadas (New England Biolabs). *AgeI* y *AvaI* en buffer 4 y *KpnI* en buffer 1 con BSA. Se incubó a 37 °C durante 2 horas y media.

#### **7.2.3.16 Secuenciación de ADN**

El secuenciado fue realizado por la empresa MacroGen Korea con los *primers* descriptos para ese uso en Tabla 7-3.

#### **7.2.3.17 Mutagénesis sitio dirigida**

Las mutaciones en el gen *phZ* se introdujeron en el plásmido pMB02 (Ver Tabla 7-2) mediante el método descrito por Papworth *et al.*, 1996 con algunas modificaciones del protocolo. Los *primers* se diseñaron de forma tal de que el *Forward* y el *Reverse* tuvieran un solapamiento total o casi total, que el cambio a introducir quedará situado en la parte central de los *primers* y que la longitud fuera de 25-45pb (Ver Tabla 7-3 ). Las amplificaciones se realizaron con Hi Fidelity

(Thermo Scientific) en un volumen final de 50  $\mu$ l con: 5  $\mu$ l de buffer de enzima, 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$ , 5  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) (Promega), 5  $\mu$ l de DMSO (Sigma), 2,5  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de enzima y 200 ng de vector. Se utilizó un programa de 30 segundos a 94°C y 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C y 6 minutos a 72°C. Para eliminar la hebra parental del plásmido el producto obtenido se trató con DpnI (Fermentas) en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l se agregaron: 2  $\mu$ l de buffer Tango (10x), 10  $\mu$ l del producto amplificado y 2  $\mu$ l de enzima (20 unidades) se incubó a 37°C durante 2 horas. El volumen total de digestión se dializó para eliminar sales y se transformaron células TOP10 de *E. coli* según el protocolo descrito en 7.2.3.13. Mediante secuenciación se verificó que los vectores seleccionados hubieran incorporado la mutación. Los *cassette* con el transportador mutante se construyeron según el protocolo descrito en sección 7.2.3.6.

## 7.2.4 Análisis Bioinformáticos

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

### Programas utilizados:

#### Alineamiento de secuencias:

- ClustalW:

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)

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

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

#### Predictores de estructura secundaria de proteínas:

- Sosui: [http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)
- TMHMM Server v. 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

### Secuencias analizadas:

**Proteínas NAT:** UapA y UapC de *A. nidulans* (GI: 88984992, 790973); Lpe1 de *Zea mays* (GI: 162462794); SNBT1 de *Rattus norvegicus* (GI: 284010030); SVCT1 y SVCT2 de *Homo sapiens* (GI: 6652824, 6048257); XanQ, XanP, YgfU, UraA y RutG de *E. coli* (GI: 161784262,

84028014, 85675700, 187775829, 89107857); PucJ de *Bacillus subtilis* (GI: 16080296) y PyrP de *Lactococcus lactis* (GI: 15673585).

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

Hipotéticas: GI: 358370293 (*A.kawachii*), GI: 189191058 (*P.tritici*), GI: 169622172 (*P.nodorum*), GI: 396492637 (*L. maculans*), GI: 116193889, GI: 367034109 (*M.thermoph*), GI: 596709773 (*C.gloespor*), GI: 453080163 (*S.musiva*), GI: 590012949 (*C.coronata*), GI: 358393328 (*T. atrovir*), GI: 119479369 (*N.fischeri*), GI: 512189572 (*O. piceae*), GI: 494830282 (*C.apollin*), GI: 398388717 (*Z. tritici*), GI: 451854940 (*B. sorok*), GI: 576917527 (*B. zeicola*), GI: 578485511 (*B. victoriae*), GI: 452001101 (*B. maydis*), GI: 573991943 (*C. militaris*), GI: 443411638 (*A. versicolor*), GI: 589991804 (*C. psammophila*), GI: 350639049 (*A. niger*), GI: 576930940 (*B. oryzae*), GI: 576035558 (*C. thermophil*), GI: 615469318 (*C. fioriniae*), GI: 402077590 (*G. graminis*), GI: 599156565 (*A. ruber*), GI: 315055049 (*A. gypseum*), GI: 213408273 (*S. japonicus*), GI: 400596682 (*B. bassiana*), GI: 472239713 (*B. fuckeliana*), GI: 310793980 (*C.graminicola*), GI: 584145752 (*F. verticillioides*), GI: 401882702 (*T.asahii*), GI: 156048879 (*S. sclerotiorum*), GI: 517318811 (*F. fujikuroi*), GI: 565936782 (*C. carrionii*), GI: 471559286 (*E. utyplata*), GI: 320589670 (*G. clavigera*), GI: 500251892 (*T. minima*), GI: 58997366 (*C. yegresii*), GI: 302884187 (*N. haematococca*), GI: 528062016 (*S. octosporus*), GI: 225556475 (*A. jellcapsulatus*), GI: 407920054 (*M. phaseolina*), GI: 501307230 (*P. hubeiensis*), GI: 521584086 (*P.flocculosa*), GI: 573065280 (*P. fici*), GI: 557998249 (*P. brasiliensis*), GI: 440468906 (*M. oryzae*), GI: 343428447 (*S. reilianum*), GI: 573029754 (*P. aphidis*), GI: 443899388 (*P. antarctica*), GI: 521722925 (*Gloeophyllum trabeum*), GI: 595781246 (*Fomitiporia mediterranea*), GI: 597992433 (*Dichomitus squalens*), GI: 336369088 (*Serpula lacrymans*), GI: 599122090 (*Punctularia strigosozonata*), GI: 618806649 (*Stereum hirsutum*), GI: 392588600 (*Coniophora puteana*), GI: 554914259 (*Moniliophthora roreri*), GI: 353235156 (*Piriformospora indica*), GI: 590011739 (*Capronia epimyces*) GI: 330906269 (*Pyrenophora teres*), GI: 477525551 (*Colletotrichum orbiculare*), GI: 599397707 (*Phanerochaete carnosae*), GI: 575060964 (*Heterobasidion irregulare*), GI: 597992433 (*Dichomitus squalens*), GI: 302683160 (*Schizophyllum commune*), GI: 449544940 (*Ceriporiopsis subvermispora*), GI: 636625831 (*Trametes versicolor*), GI: 170109364 (*Laccaria bicolor*), GI: 299738341 (*Coprinopsis cinerea okayama*), GI: 597994313 (*Agaricus bisporus*), GI: 598048335 (*Auricularia delicata*), GI: 326499876 (*Hordeum vulgare*), GI: 125551859 (*Oryza sativa*), GI: 502136834 (*Cicerarietinum*), GI: 302796270 (*Selaginella moellendorffii*), GI: 147819656 (*Vitis vinifera*), GI: 567886708 (*Citrus clementina*), GI: 565391207 (*Solanum tuberosum*), GI:

527197732 (*Genlisea aurea*), GI: 21554071 (*Arabidopsis thaliana*), GI: 168033073 (*Physcomitrella patens*), GI: 567200656 (*Eutrema salsugineum*), GI: 593328366 (*Phaseolus vulgaris*), GI: 571460543 (*Glycine max*), GI: 255586115 (*Ricinus communis*), GI: 587908567 (*Morus notabilis*), GI: 470144135 (*Fragaria vesca*), GI: 604300267 (*Mimulus guttatus*), GI: 224139332 (*Populus trichocarpa*), GI: 449441564 (*Cucumis sativus*), GI: 460381162 (*Solanum lycopersicum*), GI: 586689742 (*Amborella trichopoda*), GI: 473826365 (*Triticum urartu*), GI: 226528310 (*Zea mays*), GI: 546160295 (*C.intestinale*), GI: 116696514 (*Ralstonia eutropha*), GI: 22127989 (*Yersinia pestis*), GI: 516122851 (*Bacillus coagulans*), GI: 515872313 (*Spirulina subsalsa*), GI: 497052303 (*Parvimonas sp.*), GI: 428211868 (*Oscillatoria acuminata*), GI: 167631128 (*Heliobacterium modesticaldum*), GI: 495748271 (*Lactobacillus geriorum*), GI: 544922058 (*Treponema socranskii*), GI: 551033242 (*Butyrivibriosp.*), GI: 118444346 (*Clostridium novyi*), GI: 510834695 (*Clostridium sartagoforme*), GI: 515922313 (*Clostridium botulinum*), GI: 491355611 (*Clostridium celatum*), GI: 494497625 (*Clostridium bartlettii*), GI: 546544774 (*Clostridium chauvoei*), GI: 550917807 (*Clostridium saccharobutylicum*), GI: 488642934 (*Clostridium butyricum*), GI: 488667816 (*Clostridium colicanis*), GI: 302874741 (*Clostridium cellulovorans*).



## 8 Bibliografía

---

- Amillis, S; Kosti, V; Pantazopoulou, A; Mikros, E; Diallinas, G . (2011). Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. . *J Mol Biol.* 1, 1 (3), 567-80.
- Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (2004). Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidial. *Mol microbiol* , 52, 205-216.
- 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. *J Mol Biol* , 313, 765–774.
- Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., & Glatigny, A. (1999). The hxb gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol microbiol* , 31, 1065-1073.
- André, B., & Haguenaer-Tsapis, R. (2004). Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. *Top Curr Genet* , 9, 273–323.
- Arst, H.N., & MacDonald, D. (1973). A Mutant of *Aspergillus nidulans* Lacking Nadp-Linked Glutamate Dehydrogenase. *Mol Gen Genet* , 122, 261-265.
- Arst, H. N., & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* , 126, 111-141.
- Arst, H. N., & Scazzocchio, C. (1975). Initiator constitutive mutation with an 'up-Promoter' Effect in *Aspergillus nidulans*. *Nature* , 254, 31-34.
- Banks, G., Shelton, P., Kanuga, N., Holden, D., & Spanos, A. (1993). The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* , 131, 69–78.
- Barraco Vega, M. (2010). Estudios de expresión génica de transportadores de purinas en *Phanerochaete chrysosporium* mediante PCR en tiempo real. Montevideo. Presentado en Facultad de Ciencias, UdelaR para la obtención del título de Licenciado en Bioquímica.
- Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., et al. (2012). A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol* , 196 (2), 247-59.
- 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. *Biochem Soc Trans* , 36, 791–796.
- Bellofato, V. (2007). Pyrimidine transport activities in trypanosomes. *Trends Parasitol* , 23, 187-9.
- Blondel, M., Morvan, J., Dupre, S., Urban-Grimal, D., Haguenaer-Tsapis, R., & Volland, C. (2004). Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uraci binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell* , 15, 883–895.
- Caddick, M. X (1992). Characterization of a major *Aspergillus* regulatory gene, areA. En U. S. Tudzynski (Ed.), *Molecular Biology of Filamentous Fungi* (págs. 141-152.). Weinheim.: VC1-I Press.
- Caddick, M. X., Arst, H. N., Taylor, L. H., Johnson, R. I., & Brownlee, A. G. (1986). Cloning of the regulatory gene Area mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* , 5, 1087-1090.
- Cain, N., & Kaiser, C. (2011). Transport activitydependent intracellular sorting of the yeast general amino acid permease. *Mol Biol Cell* , 22, 1919–1929.
- Carlile, M. S. (1994). *The fungi* . Londres: Academic press, .
- Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* , 3 (9), 683-97.

- 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. *J Biol Chem*, *279*, 3132-3141.
- Cecchetto, G., Richero, M., Oestreicher, N., Muro Pastor, M., Pantano, S., & Scazzocchio, C. (2012). Mutations in the basic loop of the Zn binuclear cluster of the UaY transcriptional activator suppress mutations in the dimerisation domain. *Fungal Genet Biol*, *49* (9), 731-743.
- Chun, K., Edenberg, H., Kelley, M., & Goebel, M. (1997). Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast*, *13* (3), 233-40.
- Clutterbuck, A. (1974). *Aspergillus nidulans*. En King, *Handboof of genetics* (págs. 447-510). New York: Plenum.
- Conde, A., Diallinas, G., Chaumont, F., Chaves, M., & Gerós, H. (2010). Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *Int J Biochem Cell Biol*, *42* (6), 857-68.
- Crawford, N. M. & Arst, N. H. (1993). The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet*, *27*, 115-146.
- Cultrone, A., Dominguez, Y. R., Drevet, C., Scazzocchio, C., & Fernandez-Mmartin, R. (2007). The tightly regulated promoter of the xanA gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron. *Mol Microbiol*, *63*, 1577-1587.
- Dalbey, R., & Chen, M. (2004). Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta.*, *1694* (1-3), 37-53.
- Danielsen, S., Kilstrup, M., Barilla, K., Jochimsen, B., & Neuhard, J. (1992). Characterization of the *Escherichia coli* codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol Microbiol*, *6* (10), 1335-44.
- Darlington, A., & Scazzocchio, C. (1967). Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *J Bacterio*, *93*, 937-940.
- Darlington, A., Scazzocchio, C., & Pateman, J. (1965). Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. *Nature*, *206*, 599-600.
- de Koning, H. P., Bridges, D. J., & Burchmore, R. J. (2005). Purine and pyrimidine transport in pathogenic. *FEMS Microbiol Rev*, *29*, 987-1020.
- de Koning, H., & Diallinas, G. (2000). Nucleobase transporters (review). *Mol Membr Biol*, *17*, 75-94.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., et al. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *14*, 847-56.
- Diallinas, G. (2007). *Aspergillus* Transporters. En G. Goldman, & S. Osmani, *Aspergilli, Genomics, Medical Aspects*, (págs. 301-320). CRC Press.
- Diallinas, G., & Gournas, C. (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family Lessons from model microbial genetic systems. *Channels*, *2*, 363-372.
- Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N., Cecchetto, G., & Scazzocchio, C. (1995). Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J Biol Chem*, *270*, 8610-8622.
- Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., & Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J*, *17*, 3827-3837.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D., & Haguenaer-Tsapis, R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta*, *1695*, 89-111.
- Felice, M., De Domenico, I., Li, L., Ward, D., Bartok, B., Musci, G., et al. (2005). Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J Biol Chem*, *280*, 22181-22190.

- Foley, K., Boguslavsky, S., & Klip, A. (2011). Endocytosis recycling, and regulated exocytosis of glucose transporters. *Biochemistry*, *50*, 3048–306.
- Forsberg, H., & Ljungdahl, P. (2001). Sensors of extracellular in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, *40*, 91–109.
- Frillingos, S. (2012). Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol*, *3*, 250-72.
- Frohman, M., Dush, M., & Martin, G. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *85* (23), 8998-9002.
- Fromme, J., & Schekman, R. (2005). COPII-coated vesicles: Flexible enough for large cargo? *Curr Opin Cell Biol*, *17* (4), 345–352.
- Fu, Y. H., & Marzluf, G. A. (1987). Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol*, *7*, 1691–1696.
- Galagan, J. E., et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, *438* (7071), 1105-15.
- Galan JM, M. V.-T. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*, *271*, 10946–10952.
- Galan, J., & Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J*, *16*, 5847–5854.
- Gillissen, B., Burkle, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B., et al. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *12*, 291-300.
- Glatigny, A., & Scazzocchio, C. (1995). Cloning and molecular characterization of hxA, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase i) of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, *270*, 3534-3550.
- Gómez, D., Cubero, B., Cecchetto, G., & Scazzocchio, C. (2002). PrnA, a Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for in vivo binding. *Mol Microbiol.*, *44* (2), 585-97.
- Gómez-Esteban, P. (06 de Julio de 2009). *El Tamiz*. Obtenido de <http://eltamiz.com/2009/07/06/premios-nobel-quimica-1902-azucares-purinas-y-peptidos/>
- Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S., & Diallynas, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol Membr Biol*, *22*, 263–275.
- Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S., & Diallynas, G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, *45*, 459-472.
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A., & Diallynas, G. (2010). Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol Microbiol.*, *75* (1), 246-6.
- Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallynas, G., & Scazzocchio, C. (2011). Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, *48* (8), 840-8.
- Gournas, C., Papageorgiou, I., & Diallynas, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosys*, *4*, 404-16.
- Haas, H., Bauer, B., Redl, B., Stoffler, G. & Marzluf, A. G. (1995). Molecular cloning and analysis of nre, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet*, *27*, 150–158.
- Hettema, E., Valdez-Taubas, J., & Pelham, H. (2004). Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J*, *23*, 1279–1288.
- Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *19*, 141–172.
- Hickey, P. C. (2009). Imaging living cells of *Aspergillus*. *Medical Mycology*, *47* (Suppl 1:S), 110-9.
- Horst, R., Zeh, C., Saur, A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., & Voll, L. (2012). The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryot Cell*, *11* (3), 368-80.

- Hyde, R. J., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol*, 18, 53-63.
- Ibáñez, C. (2010). Fisiología de hongos filamentosos: Efectos del Zn y el Mn. Montevideo: Presentado en Facultad de Química, UdelaR para la obtención del título de Doctor en Química.
- Iriarte, A., Sanguinetti, M., Fernández-Calero, T., Naya, H., Ramón, A., & Musto, H. (2012). Translational selection on codon usage in the genus *Aspergillus*. *Gene*, 506 (1), 98-105.
- Ishii, T., Zerr, P., Xia, X., Bond, C., Maylie, J., & Adelman, J. (1998). Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*, 239, 53-71.
- Jain, S., Sutchu, S., Rosa, P., Byram, R., & Jewett, M. (2012). *Borrelia burgdorferi* harbors a transport system essential for purine salvage and mammalian infection. *Infect Immun*, 80 (9), 3086-93.
- Jargeat, P., Gay, G., Debaud, J., & Marmeisse, R. (2000). Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. *Mol Gen Genet*, 263, 948-956.
- Jargeat, P., Rekanigalt, D., Verner, M., Gay, G., Debaud, J., Marmeisse, R., et al. (2003). Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Curr Genet*, 43 (3), 199-205.
- Kafer, E. (1958). An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.*, 9, 105-45.
- Karachaliou, M., Amillis, S., Evangelinos, M., Kokotos, A., Yalellis, V., & Diallynas, 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. *Mol Microbiol*, 88 (2), 301-17.
- Karena, E., & Frillingos, S. (2011). The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 286 (45), 39595-605.
- Kmetzsch, L., Staats, C., Simon, E., Fonseca, F., Oliveira, D., Joffe, L., et al. (2011). The GATA-type transcriptional activator Gat1 regulates nitrogen uptake and metabolism in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*, 48 (2), 192-9.
- Kosti, V., Lambrinidis, G., Myrianthopoulos, V., Diallynas, G., & Mikros, E. (2012). Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Family. *PLoS ONE*, 7 (7), e41939.
- Kosti, V., Papageorgiou, I., & Diallynas, G. (2010). Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter. selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol*, 397 (5), 1132-43.
- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., et al. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol*, 3, 499-513.
- Kozmin, S., Stepchenkova, E., Chow, S., & Schaaper, R. (2013). A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic Purine Analogs. *Mbio*, 4 (6), e00661-13.
- Kryptou, E., & Diallynas, G. (2014). Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 63, 1-8.
- Kryptou, E., Kosti, V., Amillis, S., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., & Diallynas, G. (2012). Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 Transporter. *J Biol Chem*, 287 (44), 36792-36803.
- Kryptou, E., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E., & Diallynas, G. (2014). Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol*, 93 (1), 129-45.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F. (1990). The regulatory gene areA. *EMBO J*, 9, 1355-1364.

- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., & André, B. (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol*, *20*, 196–204.
- Lee, I., Lim, J., Ormerod, K., Morrow, C., & Fraser, J. (2012). Characterization of an Nmr homolog that modulates GATA factor-mediated nitrogen metabolite repression in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, *7* (3), e32585.
- Léon, S., Erpapazoglou, Z., & Haguenaer-Tsapis, R. (2008). Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multi-vesicular bodies. *Mol Biol Cell*, *19*, 2379–2388.
- Lewis, C., & Fincham, J. (1970). Regulation of nitrate reductase in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *J Bacteriol*, *103* (1), 55-61.
- Lewis, N., Hurt, P., Sealy-Lewis, H., & Scazzocchio, C. (1978). The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur J Biochem*, *91* (1), 311-6.
- Liu, H., De Souza, C., Osmani, A., & Osmani, S. (2009). The three fungal transmembrane nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans* are dispensable in the presence of an intact an-nup84-120 Complex. *Mol. Biol Cell*, *20* (2), 616-630.
- Liu, X., & Culotta, V. (1999). Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. *J Biol Chem*, *274*, 4863–4868.
- Lloyd, A., & Sharp, P. (1991). Codon usage in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, *230* (1-2), 288-94.
- Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., et al. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, *472* (7342), 243-6.
- Macgurn, J., Hsu, P., Smolka, M., & Emr, S. (2011). TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell*, *147*, 1104-1117.
- Mackay, E. M., & Pateman, J. A. (1982). The Regulation of Urease Activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet*, *20*, 763-776.
- Manfredi, J. P., & Holmes, E. W. (1984). Control of the purine nucleotide cycle in extracts of rat skeletal muscle: effects of energy state and concentrations of cycle intermediates. *Arch Biochem Biophys*, *233*, 515-529.
- Mansfield, T., Schultes, N., & Mourad, G. (2009). AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, *583* (2), 481-6.
- Martinez, D., Larrondo, L., Putnam, N., Gelpke, M., Huang, K., Chapman, J., et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, *22* (6), 695 - 700.
- Marzluf, G. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol rev*, *61*, 17-32.
- Maurino, V. G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K., & Flugge, U. I. (2006). Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, *47*, 1381-93.
- Meacock, S., Greenfield, J., & High, S. (2000). Protein targeting and translocation at the endoplasmic reticulum membrane through the eye of a needle? *Essays Biochem*, *36*, 1-13.
- Meintanis, C., Karagouni, A., & 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. *Mol Membr Biol.*, *17* (1), 47-57.
- Merhi, A., & André, B. (2012). Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol Cell Biol*, *32*, 4510–4522.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., & Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, *7* (8), 766-72.
- Minehart, P. & Magasanik, B. (1991). Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell.*, *12*, 6216–6226.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Momany M*, *5* (6), 580-5.

- Munteanu, B., Braun, M., & Boonrod, K. (2012). Improvement of PCR reaction conditions for site-directed mutagenesis of big plasmids. *J Zhejiang Univ Sci B*, 13 (4), 244-7.
- Muro-Pastor, M.I, Strauss, J., Ramón, A. & Scazzocchio, C. (2004). A paradoxical mutant GATA factor. *Eukaryot Cell*, 2, 393-405.
- Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F., & Scazzocchio, C. (1999). The GATA factor Area is essential for chromatin remodelling in a Eukaryotic bidirectional promoter. *EMBO J*, 18, 1584-1597.
- Murray, A. W. (1971). The biological significance of purine salvage. *Annu Rev Biochem*, 40, 811-826.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C., Osmani, A., Uki, I. L., Murray, S., et al. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172 (3), 1557-66.
- Nishimura, N., & Balch, W. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*, 277, 556-558.
- Oakley, C., Weil, C., Kretz, P., & Oakley, B. (1987). Cloning of the ripoB locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 293-298.
- Oestreicher, N., & Scazzocchio, C. (1993). Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 268, 23382-23389.
- Oestreicher, N., Sealy-Lewis, H., & Scazzocchio, C. (1993). Characterisation, cloning and integrative properties of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 132, 185-192.
- Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2007). Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 657-75.
- Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol Membr Biol*, 337-348.
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N., Hatzinikolaou, D., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., et al. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Bio*, 44 (77), 627-40.
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., & Diallinas, G. (2008). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol*, 382, 1121-1135.
- Papakostas, K., Botou, M., & Frillingos, S. (2013). Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*, 288 (52), 36827-40.
- Papworth, C., Bauer, J., Braman, J., & Wright, D. (1996). Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies*, 9 (3), 3-4.
- Park, D. (1976). Carbon and nitrogen levels as factors influencing fungal decomposers. En *The role of terrestrial and aquatic organism in decomposition processes*. , J.M Anderson & A. Macfayden (Ed.) Oxford.: Blackwell.
- Pendyala, L., & Wellman, A. (1977). Developmental-stagedependent adenine transport in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol*, 131, 453-462.
- Perry, A., & Lithgow, T. (2005). Protein targeting: entropy, energetics and modular machines. *Curr Biol*, 15 (11), R423-5.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9), e45.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., & Bufton, A. W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, 5, 141-238.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., et al. (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an Hgatar sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA Factor Area. *EMBO J*, 16, 16, 3974-3986.
- Ribard, C., Rochet, M., Labedan, B., Daignan-Fornier, B., Alzari, P., Scazzocchio, C., et al. (2003). Sub-families of alpha/Beta barrel enzymes: A new adenine deaminase family. *J Mol Biol*, 334, 1117-1131.

- Risinger, A., & Kaiser, C. (2008). Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol Biol Cell*, *19*, 2962–2972.
- Risinger, A., Cain, N., Chen, E., & Kaiser, C. (2006). Activity-dependent reversible inactivation of the general amino acid permease. *Mol Biol Cell*, *17*, 4411–.
- Saier, M. J. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, *64*, 354–411.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (tercera ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxild, H. H., & Nygaard, P. (1991). Regulation of levels of purine biosynthetic enzymes in *Bacillus Subtilis*: Effects of changing purine nucleotide pools. *J Gen Microbiol*, *127*, 2387-2394.
- Scazzocchio, C. (2000). The Fungal GATA Factors. *Curr Opin Microbio*, *3*, 126-131.
- Scazzocchio, C. (1994). The purine degradation pathway genetics biochemistry and regulation. *Prog Ind Microbiol*, *29*, 221-257.
- Scazzocchio, C., & Arst, H. N. (1978). The nature of an initiator constitutive mutation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, *274*, 177-179.
- Scazzocchio, C., & Darlington, A. J. (1968). The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, *166*, 557-568.
- Scazzocchio, C., Sdrin, N., & Ong, G. (1982). Positive regulation in a eukaryote study of the Uay gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles dominance and complementation studies and a fine structure map of the Uay-Oxpa Cluster. *Genetics*, *100*, 185-208.
- Séron, K., Blondel, M., Haguenaer-Tsapis, R., & Volland, C. (1999). Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. *J Bacteriol*, *181*, 1793–1800.
- Shi, Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys*, *42*, 51-72.
- Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Rutherford, N. G., O'Reilly, J., Henderson, P. J., et al. (2008). Crystallization of the hydantoin transporter Mhp1 from *Microbacterium liquefaciens*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *64* (Pt 12), 1172-4.
- Siddiqui, A., & Brandriss, M. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol Cell Biol.*, *9* (11), 4706-12.
- Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*, 609–622.
- Stewart, V., & Vollmer, S. J. (1986). Molecular cloning of nit-2, a regulatory gene required for nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Gene*, *46*, 291–295.
- Strauss, J., Muro-Pastor, M., & Scazzocchio, C. (1998). The regulator of nitrate assimilation in ascomycetes is a dimer which binds a nonrepeated, asymmetrical sequence. *Mol Cell Biol*, *18* (3), 1339-48.
- Suarez, T., De Queiroz, M. V., Oestreicher, N., & Scazzocchio, C. (1995). The Sequence and binding specificity of uay, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the ppr1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, *14*, 1453-1467.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., et al. (2007). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, *1* (6), 3111-20.
- Tavoularis, S., Tazebay, U., Diallinas, G., Sideridou, M., Rosa, A., Scazzocchio, C., et al. (2003). Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. *Mol Membr Biol*, *20* (4), 285-97.
- Tazebay, U., Sophianopoulou, V., Cubero, B., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (1995). Post-transcriptional control and genetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett.* *1995*, *132* (1-2), 27–37.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G., Zabicky-Zissman, J., Lockington, R., & Davies, R. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, *26* (2-3), 205-21.

- Toews, M., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., et al. (2004). Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet* , 45 (6), 383-9.
- Urban-Grima, I. D., Pinson, B., Chevallier, J., & Haguenaer-Tsapis, R. (1995). Replacement of Lys by Glu in a transmembrane segment strongly impairs the function of the uracil permease from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* , 308, 847-85.
- Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C., & Rosa, A. (2000). Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol* , 30 (2), 105-12.
- Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., & Rosa, A. (2004). Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol* , 41 (1), 42-51.
- Van den Ent, F., & Lowe, J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* , 67, 67-74.
- Vanden Wymelenberg, A., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., et al. (2006). Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet Biol* , 43 (5), 343-356.
- Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., & Diallinas, G. (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J Mol Biol* , 357 (3), 808-19.
- 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. *Mol Microbiol* , 68 (4), 959-77.
- Vogels, G. D., & Van der Drift, C. (1976). Degradation of purines and pyrimidines by Microorganisms. *Bacteriol Rev* , 40, 403-468.
- Volland, C., Urban-Grimal, D., Geraud, G., & Haguenaer-Tsapis, R. (1994). Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J Biol Chem* , 269, 9833-9841.
- Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M. R., & Jund, R. (1990). The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the fcy2 gene product. *Mol Microbiol* , 4, 585-596.
- Wymelenberg AV, S. G., Martinez, D., Rajangam, A., Teeri, T., Gaskell, J., Kersten, P., et al. (2005). The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J Biotechnol* , 118 (1), 17-34.
- Yabuki, N., & Ashihara, H. (1991). Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured Plant Cells. *Biochim Biophys Acta* , 1073, 474-480.
- Yeku, O., & Frohman, M. (2011). Rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Methods Mol Biol* , 703, 107-22.
- Young, J., Yao, S., Baldwin, J., Cass, C., & Baldwin, S. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* , 34, 529-547.
- Yuan, G., Fu, Y., & Marzluf, G. (1991). nit-4, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* , 11 (11), 5735-45.
- Zhu, H., & Dean, R. (1999). A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherichia coli*-Application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res* , 27, 910-911.



Los hongos utilizan una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno. El amonio y la glutamina son los compuestos preferidos pero cuando no están disponibles, son capaces de crecer con fuentes alternativas para lo cual cuentan con vías catabólicas y transportadores específicos y regulados. En particular, las purinas son utilizadas como fuente de nitrógeno por diferentes especies. La identificación de varios transportadores ha permitido caracterizar tres familias, NCS1 y NAT, conservados desde bacterias a plantas y mamíferos respectivamente; y, *AzgA-like*, que incluye homólogos en procariotas, hongos y plantas. Entre los hongos secuenciados, todos los filamentosos y *Schizosaccharomycetes sp* poseen secuencias tipo *AzgA* pero hasta la fecha los únicos integrantes con función verificada son: *AzgA* de *Aspergillus nidulans* y *AfAzgA* de *Aspergillus fumigatus*.

En el marco de estudios de basidiomycotas degradadores de madera y bajo la premisa de que el hábitat de estos organismos es limitante en nitrógeno, nuestro grupo se propuso analizar la presencia de transportadores de purinas en dos especies: *Phanerochaete chrysosporium* (organismo modelo cuyo genoma ha sido secuenciado) y *Punctularia atropurpurascens* (aislado de nuestra región). Ambos crecen en presencia de purinas como única fuente de nitrógeno.

En el presente trabajo demostramos que *P. chrysosporium* tiene dos transportadores específicos de purinas funcionales: PhU, del tipo NAT; y PhZ que pertenece a la familia *AzgA-like*. El gen *phU* se induce en presencia de purinas y en condición de carencia de nitrógeno y se reprime en presencia de amonio, urea o aminoácidos. El gen *phZ* se induce en presencia de adenina o hipoxantina, y se reprime en presencia de urea o aminoácidos. Con el objetivo de estudiar su funcionalidad, los genes fueron expresados en *A. nidulans* (cepa deficiente en los transportadores principales), cuyo catabolismo y sistema de captación de purinas están ampliamente estudiados. Así, *phU* y *phZ* fueron introducidos mediante recombinación homóloga en el mismo contexto genético. Los transformantes obtenidos permitieron identificar los sustratos transportados por cada proteína, PhZ transporta las purinas más reducidas y sus análogos mientras que PhU transporta todas las purinas y análogos. La fusión a GFP permitió establecer que ambos transportadores se localizan en la membrana en presencia de sustrato y responden a los mecanismos de regulación postraduccional del organismo hospedero: endocitosis del transportador en respuesta a amonio y presencia de sustratos.

*P. atropurpurascens* (cuyo genoma no ha sido secuenciado) tiene por lo menos un gen (*puZ*) con alta homología con transportadores *AzgA-like*, que fue clonado obteniéndose una secuencia parcial a partir de la cual se deduce una proteína de 494 residuos. Los mayores niveles de expresión del gen *puZ* a nivel transcripcional, se observan en ausencia de nitrógeno.

Por último, con las proteínas *AzgA-like* de función conocida (incluida PhZ) y proteínas hipotéticas homólogas (incluida PuZ parcial) identificamos 34 residuos invariantes y cuatro motivos conservados que caracterizan esta familia de transportadores. Seis residuos en dos de estos motivos se mutagenizaron *in vitro* para su posterior análisis con el objetivo de establecer los determinantes estructurales de la función de los transportadores de esta familia.