

Determinación de la secuencia señal de UreA, el transportador de urea de *Aspergillus nidulans*

Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, UdelaR, 2022.



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Bach. Sofía Dacosta Viotti

Orientador: Dr. Manuel Sanguinetti

Co-orientadora: Dra. Ana Ramón

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias (UdelaR)

Índice

Agradecimientos

Resumen

Abreviaturas

1. Introducción

1.1 Membranas biológicas

1.2 Proteínas de membrana

1.2.1 Transportadores de membrana plasmática

1.3 *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio eucariota

1.3.1 Ciclo de vida de *A. nidulans*

1.3.2 Utilización de urea como fuente de nitrógeno secundaria en *A. nidulans*

1.4 UreA, el transportador de urea de *Aspergillus nidulans*

1.5 Biogénesis de proteínas de membrana

1.5.1 La vía de SRP

1.6 Las secuencias señal (SS)

1.7 La pausa traduccional de la vía de SRP

1.7.1 Uso de codones y su posible rol en la cinética de la vía SRP

1.7.2 Mutante de UreA en los codones 24 y 25

1.8 Predicción de la secuencia señal de UreA

1.9 La proteína verde fluorescente

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

2.2 Objetivos específicos

3. Materiales y métodos

3.1 *Aspergillus nidulans*

3.1.1 Cepas

3.1.1.1 Descripción de los genotipos y fenotipos

3.1.2 Medios y condiciones de cultivo

3.2 Técnicas empleadas con *A. nidulans*

3.2.1 Transformación

3.1.2.1 Generación de protoplastos

3.1.2.2 Transformación

3.1.2.2 Purificación de los transformantes

3.2.2 Crecimiento en placa

3.2.3 Microscopía de epifluorescencia

3.3 Técnicas empleadas con *Escherichia coli*

3.3.1 Transformación de ligaciones pMini y pMil

3.4 Técnicas de estudio de ácidos nucleicos

3.4.1 PCR

3.4.1.1 Fusion-PCR

3.4.1.1.1 Amplificaciones

3.4.1.2 PCR para secuenciación

3.4.1.3 PCR colonia de *Escherichia coli*

3.4.1.4 Primers

3.4.2 Extracción de ácidos nucleicos

- 3.4.2.1 Extracción de ADN genómico
 - 3.4.2.2 Minipreparación de ADN plasmídico
 - 3.4.3 Visualización de ADN
 - 3.4.4 Purificación de productos de PCR
 - 3.4.5 Cuantificación de ADN
 - 3.4.6 Clonado y subclonado
 - 3.4.6.1 Vectores utilizados
 - 3.4.6.2 Ligación
 - 3.4.6.3 Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción
 - 3.4.6.4 Secuenciación
 - 3.4.6.5 Análisis de las secuencias
- 3.5 Técnicas de estudio de proteínas
 - 3.5.1 Extracción de proteínas
 - 3.5.2 Cuantificación de proteínas
 - 3.5.3 SDS-PAGE
 - 3.5.4 Western Blot
- 4. Resultados y discusión
 - 4.1 Generación de las construcciones por Fusion-PCR
 - 4.2 Transformación de la cepa MVD13A con la construcción $\Delta 2-7$
 - 4.3 Secuenciación del locus *ureA* del transformante *ureA $\Delta 2-7$*
 - 4.4 Análisis de crecimiento en placa transformante *ureA $\Delta 2-7$*
 - 4.5 Análisis de niveles de síntesis proteica mediante Western Blot del transformante *ureA $\Delta 2-7$*
 - 4.6 Determinación de la localización subcelular de UreA en el transformante *ureA $\Delta 2-7$*
 - 4.7 Clonado de Fmini y Fmil en el vector pJET
 - 4.8 Subclonado de Fmini y Fmil en el vector pZero_blunt/*pabaA*
 - 4.9 Transformación de *A. nidulans* con los plásmidos pMil/*pabaA* y pMini/*pabaA*
 - 4.10 Observación en lupa de fluorescencia
- 5. Conclusiones y Perspectivas
- 6. Referencias
- 7. Anexo
 - 7.1 Secuencia de la fusión *ureA $\Delta 2-7$::gfp::pyrGAF*
 - 7.2 Secuencia de la fusión *PgpdA1000-msGFP2-ter_crgA_AF*
 - 7.3 Secuencia de la fusión *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF*

Agradecimientos

A mis tutores Ana y Manuel.

A mis compañeras de laboratorio Juliette, Ania y Laura.

A Luciana Fleitas, por realizar la corrección de este trabajo.

A la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias.

Resumen

UreA, el transportador de urea de alta afinidad del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, permite a este organismo utilizar urea como fuente de nitrógeno. Ésta es una proteína politópica de membrana, y por lo tanto, durante su traducción la célula debe prevenir que sus múltiples segmentos transmembrana (TMD) se expongan al ambiente acuoso del citosol. El modelo aceptado para la biogénesis de este tipo de proteínas propone que las mismas ingresan a la vía de SRP (por *signal recognition particle*), en la cual, el complejo ribonucleoproteico SRP actúa reconociendo una secuencia señal (SS) hidrofóbica presente en el N-terminal de los péptidos nacientes de proteínas destinadas a la membrana plasmática. De esta manera, los complejos ribosoma-polipéptido naciente son dirigidos, por SRP a la membrana del retículo endoplasmático (RE), en donde se da la inserción cotraduccional de los TMD a través del canal de translocación Sec61. Una vez que la proteína alcanza su conformación final en la membrana del RE, ingresa a la vía secretoria, mediante la cual alcanza la membrana plasmática. En el N-terminal de UreA se encuentra una secuencia hidrofóbica que abarca los aminoácidos (AA) 2 a 7. En este trabajo se plantea como hipótesis que la misma podría ser la SS de esta proteína. Para ponerla a prueba, se generó el mutante *ureAΔ2-7* fusionado a GFP, en el que los AA 2 a 7 de UreA fueron eliminados. La caracterización del mutante *ureAΔ2-7* develó que el mismo presenta un fenotipo salvaje en cuanto al transporte de urea, su nivel de síntesis, y la localización subcelular de UreA. Dada la capacidad de SRP de reconocer una gran variedad de secuencias hidrofóbicas, este resultado no excluye la posibilidad de que el trecho de AA 2 a 7 forme parte de la SS de UreA, y que tras su ausencia SRP reconozca al primer segmento transmembrana de la proteína. Considerando esta dificultad para identificar la SS, se generaron cepas que expresan la proteína reportera msGFP2 para validar su uso como herramienta que permita a futuro la identificación de posibles SS (mediante su fusión en el N-terminal de esta proteína reportera, y el seguimiento de su localización subcelular mediante microscopía de epifluorescencia).

Abreviaturas

AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
c.s.p	cantidad suficiente para
dNTP	2-Desoxinucleótidos 5-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
kb	kilo bases
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
MPM	Marcador de peso molecular
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PIM	Proteína integral de membrana
RE	Reticulo endoplasmático
RNC	Complejo ribosoma-polipeptido naciente
SR	Receptor de SRP
SRP	Partícula de reconocimiento de la señal
SS	Secuencia señal
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Buffer Tris EDTA
TMD	Dominio transmembrana
Tris	2-amino(2-hidroximetil) propano-1,3-diol
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)

1. Introducción

1.1 Membranas biológicas

Formadas por una mono o doble capa continua de moléculas lipídicas en la que están inmersas las proteínas de membrana, las membranas biológicas definen los límites de todas las células, y, en eucariotas, también de los organelos. Los lípidos que componen las membranas biológicas son muy variados, siendo los más abundantes los fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los dos primeros son moléculas anfipáticas, que exponen sus grupos polares a ambos lados de la membrana, mientras que las colas hidrofóbicas se agrupan en el centro, actuando como una barrera, relativamente impermeable al paso de la mayoría de las moléculas solubles en agua. Los lípidos anfipáticos presentes en las membranas combinan distintos números de átomos de carbono e insaturaciones con los distintos grupos polares, para generar la gran variedad de lípidos presentes en las membranas biológicas. Los esteroides en cambio, son moléculas completamente hidrofóbicas, que se asocian a las membranas interactuando con las colas hidrofóbicas de los lípidos anfipáticos. En este contexto hidrofóbico, lípidos y proteínas de membrana interactúan fundamentalmente a través de interacciones no covalentes, formando una estructura fluida, en la cual pueden difundir, así como formar dominios estables de composiciones específicas. Las propiedades de las membranas (flexibilidad, estabilidad y fluidez) son determinadas por las propiedades de los distintos lípidos presentes en las mismas y su cantidad relativa. De esta forma, las membranas biológicas mantienen diferencias esenciales entre el interior y exterior celular, así como también entre el citosol y los distintos organelos y brindan a las células protección mecánica. En adición a estas funciones generales, se encuentran aquellas específicas, realizadas por las proteínas presentes en las membranas biológicas (Alberts, 2015).

1.2 Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana permiten a las células llevar a cabo múltiples funciones indispensables para el correcto funcionamiento celular. Se encuentran en las membranas de todas las células, formando parte de vías metabólicas claves, como la respiración o la fotosíntesis, realizando el transporte de solutos y participando en la transducción de señales. De esta forma, los lípidos de membrana proporcionan la estructura básica de las membranas biológicas, y las proteínas de la membrana realizan la mayoría de las tareas específicas, y por lo tanto, dan a cada tipo de membrana celular sus propiedades funcionales características. Al igual que los lípidos de membrana, son anfipáticas y se asocian a las membranas de distintas formas. Las proteínas integrales de membrana (PIM) son aquellas que atraviesan completamente la membrana, y a su vez se clasifican como monotópicas, que atraviesan la membrana una única vez a través de un segmento transmembrana (TMD) o politópicas, aquellas que lo hacen a través de múltiples TMD. Las regiones transmembrana, compuestas principalmente por aminoácidos (AA) hidrofóbicos, interactúan con las colas hidrofóbicas de las moléculas lipídicas del interior de las bicapas y

sus regiones hidrofílicas se exponen al medio acuoso a ambos lados de la membrana. La mayoría de los segmentos que atraviesan la membrana lo hacen en conformación α hélice. Esto se debe al entorno apolar en el que se encuentran, sin moléculas de agua presentes. La naturaleza polar de los enlaces peptídicos, lleva a que los átomos que los conforman formen enlaces de hidrógeno con los enlaces peptídicos vecinos, y la formación de enlaces de hidrógeno se maximiza cuando el péptido adopta conformación α hélice. Una forma alternativa para que los enlaces peptídicos puedan satisfacer sus requerimientos de enlaces de hidrógeno, es que los segmentos transmembrana se dispongan en láminas beta (β), formando un cilindro, llamado barril β . Otras proteínas de membrana se disponen completamente en el citosol o en la región extracelular, y se anclan a lípidos mediante enlaces covalentes. Por último, las proteínas periféricas de membrana se unen de forma indirecta a través de interacciones, que pueden ser transitorias, con otras proteínas o lípidos de la membrana. Cada proteína tiene una orientación dada en la membrana; esto no solo refleja su función sino que también su mecanismo de síntesis, sobre el cual se profundiza más adelante (Alberts, 2015).

1.2.1 Transportadores de membrana plasmática

Las células desarrollaron sistemas para transportar moléculas hidrosolubles a través de la membrana en forma específica, con el fin de obtener nutrientes, excretar productos residuales, regular la concentración intracelular de los iones, entre otros procesos de importancia fisiológica. Las proteínas de transporte o transportadoras que llevan a cabo estas tareas, se clasifican en dos clases principales: canales y transportadores o *carriers* (Busch & Saier, 2002; Saier, 2000). Cada transportador suele transportar sólo una clase particular de moléculas tales como iones, azúcares, AA, péptidos, e incluso proteínas plegadas. A diferencia de los canales que forman poros angostos a través de la membrana permitiendo la difusión pasiva de iones y moléculas de agua, los transportadores se unen al soluto específico que transportan, y mediante cambios conformacionales exponen el sitio de unión al soluto alternativamente a ambos lados de la membrana, realizando así el transporte. Las proteínas asociadas al transporte de distintas moléculas son proteínas del tipo politópicas, que presentan un número variable de TMD. El transporte puede ser pasivo o activo. Los transportadores que realizan transporte activo, se pueden clasificar según el tipo de energía que utilizan para acoplar al transporte: los transportadores activos primarios son aquellos que utilizan fuentes de energía primarias como las provenientes de una reacción química, mientras que los transportadores activos secundarios utilizan fuentes de energía secundaria, tales como los gradientes electroquímicos y la fuerza protón motriz (generadas a expensas de los transportadores primarios). A su vez, los transportadores activos secundarios pueden ser uniportadores, simportadores o antiportadores. Los uniportadores catalizan el transporte de una única especie, los simportadores el de dos o más especies en el mismo sentido, mientras que los antiportadores catalizan el intercambio de dos o más especies, en sentido contrario, a través de la membrana (Saier, 2000) (Figura 1).

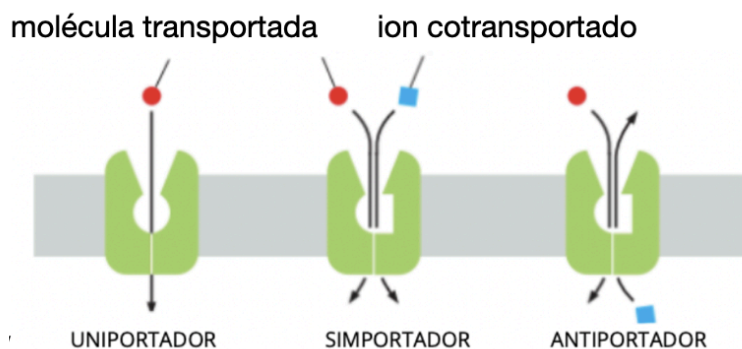


Figura 1. Diagrama esquemático del funcionamiento de los transportadores de membrana como uniportadores, simportadores y antiportadores. Modificado de Alberts, 2015.

Estas proteínas transportadoras de membrana también están involucradas en procesos de transducción de señales, importantes para la respuesta a diversos estímulos que permiten a los organismos vivos adaptarse generando una respuesta acorde al contexto en el que se encuentran. El mal funcionamiento de estas proteínas se explica la ocurrencia de diversas patologías. Además, las proteínas transportadoras son uno de los principales blancos de acción de las drogas de terapia empleadas (Overington et al., 2006), ya que la efectividad de distintos tratamientos está sujeta al transporte de las drogas hacia el interior celular. En este sentido, el estudio de los distintos procesos detrás de la biogénesis de las proteínas y cómo éstas funcionan es de fundamental importancia, no solo para el conocimiento del transporte como función celular, sino que también para sus aplicaciones en el área de la salud. En comparación con otras clases de proteínas, el conocimiento de diferentes aspectos de la biología de las proteínas integrales de membrana se ve desfavorecido, en parte por las dificultades para establecer condiciones experimentales que permitan su estudio preservando la conformación y la funcionalidad al aislarlas de su medio nativo. Es por esto que la utilización de modelos eucariotas simples, que permiten la realización de mutantes y la evaluación de su efecto fácilmente, ha significado un gran aporte para la comprensión de diversos aspectos de la biología de las proteínas de membrana. Un ejemplo de esto, son los trabajos realizados en *Aspergillus nidulans* sobre proteínas transportadoras, los cuales han dado lugar a nuevos conocimientos que se extienden más allá de la biología de los hongos (revisado en Diallinas & Martzoukou, 2019).

1.3 *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio eucariota

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso, perteneciente al filo Ascomycota, que ha sido ampliamente utilizado como modelo desde hace ya varias décadas. El género *Aspergillus* comprende una variedad de especies, entre las cuales muchas son de importancia en la industria alimentaria y desde un punto de vista médico, dado que presentan patogenicidad hacia animales o plantas. El conocimiento de la bioquímica y biología molecular de este organismo ha permitido realizar contribuciones importantes a dichas áreas. *A. nidulans* presenta varias características que lo convierten en un excelente organismo modelo. Se trata de un organismo con requerimientos nutricionales mínimos y simples, y de rápido

crecimiento que permite contar con grandes cantidades de biomasa en cortos períodos de tiempo (2-3 días), así como también estudiar su crecimiento en distintas condiciones en relativamente poco tiempo. Su crecimiento en agar, resulta en colonias compactas, que pueden convivir en una misma caja de Petri con colonias de otras cepas, permitiendo una sencilla comparación de fenotipos, que se realiza simplemente a través de la observación del crecimiento de las colonias. Por otro lado, su genoma, haploide y de tamaño pequeño (de unos 3.1×10^7 pb, repartidos en 8 cromosomas) ha sido secuenciado (Galagan et al., 2005). Dada la importancia de este género, hay mucha información disponible sobre las especies que lo componen, sus características genéticas, metabólicas y su ciclo de vida. Otra de las grandes ventajas que presenta este organismo, es que su genoma es fácilmente manipulable mediante distintas metodologías (Szewczyk et al., 2006; Tilburn et al., 1983; Todd et al., 2007). Asimismo presenta una alta tasa de doble recombinación, lo que permite transformar y dirigir integraciones a un *locus* determinado. Además, se encuentran a disposición muchas cepas con diversas auxotrofias, que permiten seleccionar transformantes en los que genes marcadores son interrumpidos, o complementados, para su uso en análisis genéticos. Muchas otras especies del género *Aspergillus* han sido secuenciadas, por lo que este organismo también permite realizar estudios a nivel evolutivo. De estas especies, muchas no son de tan simple manipulación y estudios realizados en *A. nidulans* mostraron resultados extrapolables a las mismas (Todd et al., 2007).

1.3.1 Ciclo de vida de *A. nidulans*

A. nidulans presenta 3 ciclos proliferativos diferentes: asexual, parasexual y sexual (Figura 2). *A. nidulans* crece como hifas filamentosas vegetativas haploides después de la germinación de conidios uninucleados (ciclo asexual) o de ascosporas binucleadas (ciclo sexual). Durante el ciclo asexual, las hifas haploides desarrollan conidióforos que dan lugar a las conidiosporas, uninucleadas (motivo por el cual como se describe en Materiales y Métodos, se utilizan estas esporas para purificar transformantes), que pueden germinar y formar hifas nuevamente, cerrando el ciclo. A su vez, las hifas vegetativas de dos individuos distintos, se pueden fusionar, dando lugar a un heterocarionte, cuyos núcleos pueden fusionarse, formando hifas diploides durante un periodo de tiempo, y luego dar lugar nuevamente a homocariontes (ciclo parasexual). Durante el desarrollo sexual, se forman estructuras especializadas, que dan lugar a los ascos, donde se formarán las ascosporas (binucleadas) producto de la meiosis (Todd et al., 2007). En este trabajo, se manipuló al organismo en su estado haploide.

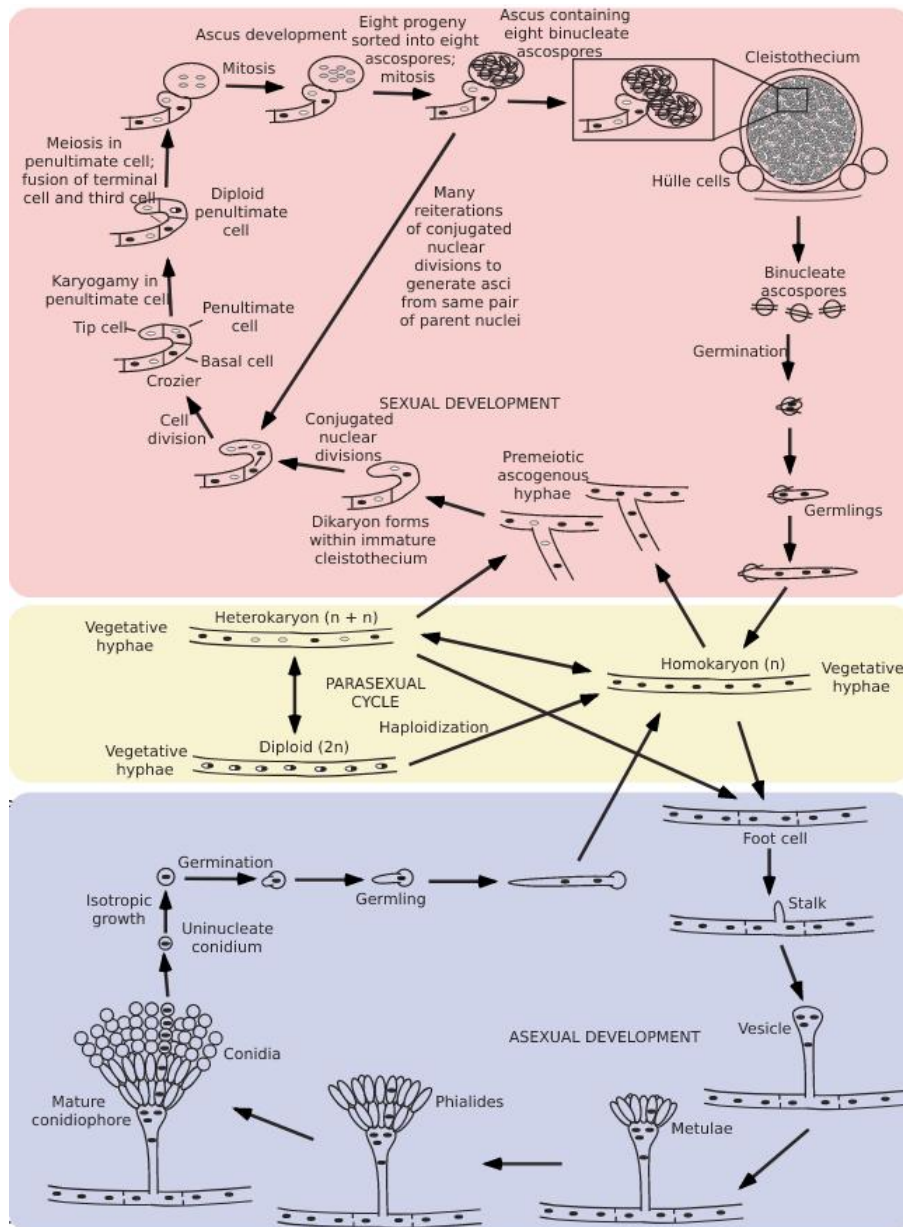


Figura 2. Ciclo de vida de *A. nidulans*. Tomado de Todd et al., 2007.

1.3.2 Utilización de urea como fuente de nitrógeno secundaria en *A. nidulans*

Muchos hongos tienen la capacidad de utilizar una amplia variedad de fuentes de nitrógeno. Esto depende de la expresión de un gran número de genes estructurales que median la captación y utilización de una variedad diversa de compuestos, en las circunstancias en las que son requeridos. La glutamina y el amonio son sus fuentes de nitrógeno preferenciales, pero cuando éstas escasean en el medio, el organismo puede utilizar fuentes de nitrógeno secundarias presentes, como nitrato, purinas, otros aminoácidos, y metabolitos como la urea. La urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), es una molécula orgánica pequeña (75.3 Å), y altamente polar, compuesta por dos grupos amina y un grupo carbonilo (Figura 3). Se encuentra en la naturaleza como producto del metabolismo de nitrógeno en la orina de animales, y también

es utilizada como fertilizante, siendo uno de los más usados a nivel mundial. En el caso de *A. nidulans*, la urea puede ser utilizada como única fuente de nitrógeno (Darlington et al., 1965; Scazzocchio & Darlington, 1968). El transporte de urea en *A. nidulans* fue descrito hace ya varias décadas (Pateman et al., 1982).

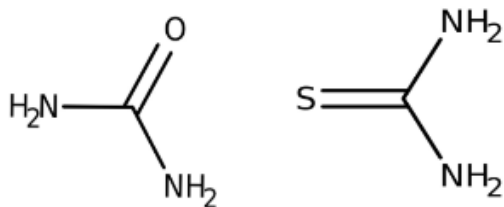


Figura 3. Representación de la molécula de urea (izquierda) y 2-tiourea (2-TU) (derecha).

A concentraciones elevadas, mayores a 3 mM, la urea es capaz de difundir a través de la membrana de *A. nidulans*, mediante un transporte pasivo de baja afinidad. A concentraciones menores, la urea puede ser captada al medio intracelular a través del transportador de membrana de alta afinidad, UreA (Abreu et al., 2010). Mediante este mismo sistema de transporte, *A. nidulans* puede incorporar 2-tiourea, un análogo tóxico de la urea (Pateman et al., 1982).

1.4 UreA, el transportador de urea de *Aspergillus nidulans*

UreA es el simportador de urea/H⁺ de alta afinidad, que permite a *A. nidulans* utilizar urea como única fuente de nitrógeno (Abreu et al., 2010). Transportadores específicos de urea han sido reportados en distintos organismos: ScDur3 en *Saccharomyces cerevisiae* (ElBerry et al., 1993), AtDur3 en *Arabidopsis thaliana* (L.-H. Liu et al., 2003), PiDur3 en *Paxillus involutus* (Morel et al., 2008), CaDur3 de *Candida albicans* (Navarathna et al., 2011), OsDur3 de *Oryza sativa* (Wang et al., 2012), y ZmDur3 en *Zea mays* (G.-W. Liu et al., 2015). En conjunto con éstos, UreA integra una subfamilia dentro de la familia de los simportadores sodio:soluto (Abreu et al., 2010; Jung, 2002), con la particularidad de que acoplan el transporte de urea a H⁺ en lugar de a Na⁺. UreA parece ser la única proteína con actividad de transporte de urea de alta afinidad en *A. nidulans*, y presenta ortólogos en las demás especies del género *Aspergillus*. Esta proteína es codificada por el gen *ureA*, el cual codifica un polipéptido de 693 AA, y se predice que presenta 15 dominios transmembrana helicoidales, con el N-terminal extracelular y C-terminal intracelular (Abreu et al., 2010). En cuanto al estudio de la funcionalidad de UreA, han sido identificados residuos conservados en sus ortólogos en hongos y plantas, que podrían cumplir roles importantes en el reconocimiento, unión y transporte de urea, así como también residuos que podrían tener funciones importantes para la estructura del transportador, en cuanto a su correcto plegamiento, y localización en la membrana plasmática (Sanguinetti et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, la utilización de urea como fuente de nitrógeno ocurre en condiciones en las que las fuentes de nitrógeno preferenciales no se encuentran disponibles, fenómeno que se conoce como represión catabólica por nitrógeno. La presencia de amonio y/o L-glutamina causan la represión de los genes que codifican para

las enzimas y transportadores involucrados en la utilización de fuentes de nitrógeno no preferenciales, incluido el del transportador de urea UreA. La expresión de éste, no es inducida por urea, sino que la misma es desreprimida en ausencia de L-glutamina y amonio, a través del factor activador de la transcripción AreA (Arst & Cove, 1973; Pateman et al., 1982). UreA también está sujeta a mecanismos de regulación que actúan a nivel post-traduccional, en los que la presencia de fuentes de nitrógeno represoras inducen la internalización por endocitosis de UreA y su degradación en vacuolas (Abreu et al., 2010).

1.5 Biogénesis de proteínas de membrana

Durante la traducción la información genética contenida en los codones ordenados de un ARNm es interpretada para generar una secuencia lineal de aminoácidos, dando origen a las proteínas. En el caso de las PIMs, la síntesis de los segmentos transmembrana de composición aminoacídica altamente hidrofóbica representa un desafío en el contexto citosólico. La exposición de residuos hidrofóbicos al medio acuoso impediría el establecimiento de interacciones que conduzcan al plegamiento adecuado, mediante el cual se establecen interacciones con los lípidos de membrana en el contexto de la bicapa lipídica, y además llevaría a la formación de agregados proteicos tóxicos para las células. En consecuencia, las células regulan la síntesis de las PIMs, mediante un mecanismo que evita la formación de agregados tóxicos y permite que las mismas alcancen su conformación y localización final adecuadas. Para comprender el proceso de biogénesis de las PIMs, es necesario tener en cuenta la diversidad de este conjunto de proteínas, cuyos TMD difieren ampliamente en secuencia, propiedades biofísicas, ubicación en la membrana, y dentro de las proteínas en su topología. Una consecuencia importante de esta diversidad es que la maquinaria encargada de la biogénesis de estas proteínas debe ser muy flexible. De hecho, actualmente se conocen distintas vías, especializadas en la biogénesis de PIMs según la posición y la hidrofobicidad de la secuencia señal (ver más adelante). Estas vías se encuentran revisadas en Hegde & Keenan, 2021.

1.5.1 La vía de SRP

En eucariotas, la síntesis de proteínas con múltiples segmentos transmembrana, como es el caso de UreA, se lleva a cabo por una vía especial de biogénesis, mediante la cual los polipéptidos nacientes son insertados cotraduccionalmente en la membrana del retículo endoplásmico (RE) mientras emergen del ribosoma. En el RE los TMD son integrados a la membrana, donde las proteínas alcanzan sus estructuras terciarias y cuaternarias finales. Una vez que estos pasos ocurren de forma exitosa, las PIMs ingresan a la vía secretoria, a través de la cual son dirigidas hacia la membrana plasmática, donde ejercerán su función. De lo contrario, una de varias vías de control de calidad determinará que las mismas sean degradadas (Hegde & Keenan, 2021). Aproximadamente el 30% del proteoma se destina inicialmente al RE eucariota o la membrana plasmática bacteriana, y la gran mayoría de estas proteínas son guiadas hacia estos sitios por la partícula de reconocimiento de la señal, SRP ("*signal recognition particle*") (Akopian et al., 2013; Hegde & Keenan, 2021).

Según el modelo actualmente aceptado, la SRP actúa reconociendo una secuencia señal (SS) N-terminal en la cadena peptídica nascente a través de la cual se une al complejo ribosoma-polipéptido nascente (RNC). En ese momento, SRP induce una pausa traduccional durante la cual dirige al RNC a la membrana del RE a través de la interacción con su receptor SR ("SRP Receptor") ubicado en la membrana del RE. Mediante esta interacción, SRP dirige a los polipéptidos nascentes destinados al RE hacia la vecindad del translocón, mientras los mismos están siendo traducidos. El translocón (Sec61 en eucariotas, SecYEG en bacterias y SecYE β en arqueas) es un complejo proteico conservado en todos los organismos, que forma un canal conductor en la membrana del RE mediante el cual conduce los polipéptidos nascentes hacia el lumen de este organelo. Su estructura proporciona además una compuerta lateral hacia los lípidos de membrana, mediante la cual integra a la bicapa lipídica los TMD de las PIM (a la vez que transloca hacia el lumen, a través del canal, los *loops* extracitoplasmáticos). Tras la interacción SRP-SR, el complejo SRP-RNC se desplaza para exponer parte del túnel de salida ribosomal a Sec61, que se une al ribosoma formando un canal conductor continuo con el túnel ribosomal a través de la membrana del RE. Una vez que el RNC es transferido al translocón, el complejo SRP-SR se desensambla y se retoma la traducción (Figura 4).

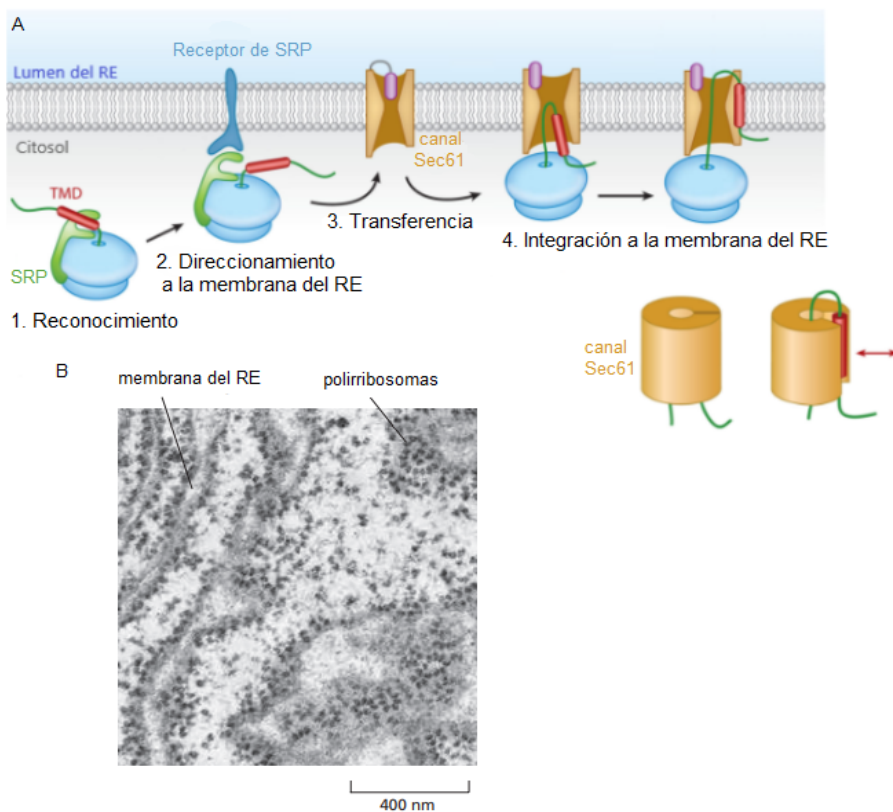


Figura 4. A) Mecanismo de translocación cotraduccional mediado por SRP. Se esquematizan los principales pasos que ocurren durante la inserción cotraduccional de proteínas de membrana. Una proteína integral de membrana es reconocida a través de un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) o secuencia señal (ver más adelante en el texto) por SRP mientras es traducida por el ribosoma, en contexto del RNC. SRP induce una pausa traduccional en el RNC, y éste es dirigido a la membrana del RE a través de la interacción de SRP con su receptor ubicado en la membrana del RE. Una vez allí, es transferido al canal de translocación Sec61 para continuar la traducción. El TMD

se integra en la membrana a través del acceso lateral a la bicapa lipídica proporcionado por el canal Sec61. En la parte inferior se esquematiza la formación de la ventana lateral del canal Sec61. La figura fue tomada y modificada de Shao & Hegde, 2011. B) Se muestra una electromicrografía en la que se observan polirribosomas asociados a la membrana del RE. Tomado y modificado de Alberts, 2015.

De esta forma, la vía de SRP está involucrada en la coordinación espacial y temporal de los eventos implicados en la síntesis de proteínas de membrana, evitando la posible agregación citosólica o el plegamiento incorrecto de estas proteínas (Akopian et al., 2013; Cymer et al., 2015; Gemmer & Förster, 2020; Shao & Hegde, 2011).

La vía de SRP está conservada en los tres dominios de la vida, y su complejidad ha aumentado considerablemente durante la evolución. En comparación con sus homólogos en bacterias, las SRP de eucariotas son significativamente mayores en tamaño así como en complejidad, y se componen de un mayor número de proteínas. El SRP más simple conocido es el de bacterias, que únicamente consiste del ARN 4.5S y de la proteína Ffh, que junto con el receptor FtsY comparten homología funcional y de secuencia con sus equivalentes en eucariotas, ARN 7SL, SRP54 y SR α respectivamente (Batey, 2000). Tanto en arqueas como en eucariotas, SRP puede dividirse, a grandes rasgos, en dos dominios funcionales: el dominio S, en el cual está incluido SRP54, y el dominio Alu compuesto por los extremos 3' y 5' de la molécula de ARN, y dependiendo del organismo puede integrarse también por distintos componentes proteicos adicionales. SRP54 (Ffh en bacterias) es el único componente proteico presente en todas las SRP, y tiene un rol esencial en el reconocimiento y unión a la SS y a SR (Akopian et al., 2013; Nagai, 2003). De hecho, se ha observado que Ffh es capaz de direccionar péptidos nacientes al RE en células de mamíferos con SRPs no funcionales (Bernstein et al., 1993). SRP54 consta de un dominio N-terminal, un dominio GTPasa a través del cual interacciona con SR y un dominio C-terminal llamado dominio M (SRP54M) por ser rico en metionina, a través del cual se postula que reconoce a las secuencias señal en la salida del túnel ribosomal (Hegde & Keenan, 2021). SRP54 es capaz de reconocer en forma eficiente y transportar específicamente diferentes SS, a pesar de que éstas pueden presentar gran variación en su secuencia (ver más adelante). Ha sido postulado que el alto contenido de metionina del dominio M proporciona un entorno hidrofóbico con suficiente plasticidad para acomodar la gran variedad de secuencias señal existentes, dada la flexibilidad de las cadenas laterales de las metioninas. El sitio de unión a la SS, se ubica entre dos hélices α y un bucle, que forman un surco profundo, ancho en los extremos y más estrecho en el centro por lo que tiene el potencial de acomodar una variedad de péptidos señal que, en general, poseen residuos de menor volumen estérico cerca del centro, exactamente donde el surco se estrecha (Figura 5). El bucle actuaría como una solapa flexible que se cierra sobre la SS (Akopian et al., 2013; Clemons Jr et al., 1999; Nagai, 2003; Hegde & Keenan, 2021). Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual SRP reconoce las SS y dirige a los péptidos nacientes hacia la membrana no ha sido descrito en su totalidad. Se ha reportado la interacción con SRP aún cuando la SS no ha emergido del ribosoma, lo que sugiere que la SS dentro del túnel ribosomal podría señalizar a través del ribosoma su presencia, sin contactar directamente con SRP, posiblemente para que SRP se posicione en la salida del túnel ribosomal antes de que la SS señal emerja, aumentando la eficiencia del

reconocimiento (Berndt et al., 2009). De todas maneras, la forma exacta en la que ocurre el reconocimiento, permanece aún como una interrogante (Hegde & Keenan, 2021).

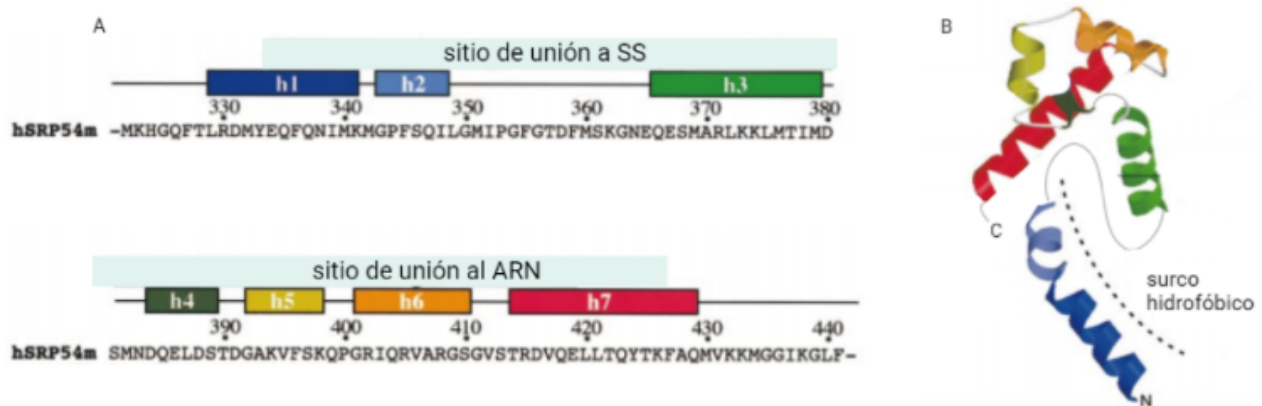


Figura 5. Estructura de SRP54M humana. A) Se muestran las hélices α 1-7 sobre la secuencia aminoacídica. B) Se indica la estructura en la que puede apreciarse el surco hidrofóbico. Los colores se corresponden con la parte A de la figura. Ambas imágenes fueron tomadas y modificadas de Clemons Jr et al., 1999.

Por su parte, el dominio Alu en mamíferos estaría involucrado en la generación de la pausa traduccional, una vez que SRP ha reconocido a la secuencia señal. Si bien muchos autores concuerdan que es necesaria una pausa traduccional en etapas tempranas de la elongación de las PIM para que las mismas puedan alcanzar su correcta localización celular (Akopian et al., 2013; Shao & Hegde, 2011a; Zhao et al., 2021), el mecanismo mediante el cual la pausa se genera continúa en discusión. Hay quienes proponen que el dominio Alu de SRP se une al ribosoma cerca del sitio de unión del factor de elongación, y que de esta forma disminuiría la velocidad de traducción (Akopian et al., 2013; Shao & Hegde, 2011a; Hegde & Keenan, 2021). Pero el mecanismo mediante el cual el dominio Alu detendría la elongación y se comunicaría y/o cooperaría con el dominio S durante el direccionamiento del RNC hacia el translocón, aún no ha podido ser determinado (Hegde & Keenan, 2021). Teniendo en cuenta que el dominio Alu no se encuentra en bacterias, si este fuera el mecanismo, sería exclusivo de eucariotas, y sin embargo la ruta de SRP mantiene su eficacia en todos los órdenes de la vida. Otro factor posiblemente implicado en la cinética de esta vía, que podría enlentecer la tasa de traducción, es la presencia de elementos en *cis* en sitios clave del transcrito, siendo los codones de uso poco frecuente buenos candidatos para cumplir esta función (Chartier et al., 2012; Hanson & Collier, 2018; Komar, 2009; Pechmann et al., 2014; Pechmann & Frydman, 2013).

1.6 Las secuencias señal (SS)

Como se mencionó anteriormente, el direccionamiento de proteínas hacia el RE depende de secuencias señal. Las SS son tramos peptídicos hidrofóbicos cortos presentes en la secuencia de AA de proteínas recién sintetizadas, que son reconocidas por la maquinaria de direccionamiento o secretoria como señales de tráfico (Liaci & Förster, 2021).

Generalmente, actúa como SS el dominio hidrofóbico más N-terminal, que puede tratarse de un péptido señal escindible, o bien del primer TMD de proteínas politópicas de membrana (Hegde & Keenan, 2021). Los primeros, se ubican en el N-terminal de la cadena nascente, y se caracterizan por tener un tamaño de 20 a 30 residuos en los cuales se encuentran: una región N-terminal de residuos básicos, un *core* de aproximadamente 8 a 12 aminoácidos hidrofóbicos, y un C-terminal levemente polar, que en ocasiones es escindido y no se encuentra en la conformación final de las proteínas (Hegde & Bernstein, 2006). En el caso de los TMD, los dominios hidrofóbicos se componen comúnmente de 15 a 25 AA hidrofóbicos (Hegde & Keenan, 2021; Shao & Hegde, 2011a). El requisito mínimo para el reconocimiento por SRP es una secuencia predominantemente hidrófoba de aproximadamente 7 AA. A pesar de que las SS de alto contenido hidrofóbico están muy conservadas en eucariotas y procariontes, su composición de secuencia aminoacídica varía ampliamente, incluso entre proteínas de un mismo organismo, por lo que el reconocimiento en lugar de ser a través de la secuencia, está basado en la hidrofobicidad así como también en la estructura secundaria (Emr & Silhavy, 1983; von Heijne, 1985). La enorme variedad de SS que pueden existir representa una dificultad al momento de predecir SS presentes en las proteínas. Es tal la variación que pueden presentar las secuencias, que un trabajo llegó a mostrar que el 20% de secuencias hidrofóbicas generadas en forma aleatoria fueron capaces de reemplazar la secuencia de secreción de la invertasa en *S. cerevisiae* (Kaiser et al., 1987). Además de depender de la hidrofobicidad de la SS, el reconocimiento por SRP es sensible a la localización de la SS en el péptido nascente. La ventana óptima de reconocimiento de SRP está dentro de los primeros ~ 95 AA del péptido nascente. Esto se debe a que respecto a los ribosomas, la concentración de SRP es subestequiométrica, y entonces el reconocimiento, para mantener su eficiencia, debe ser rápido. Si bien las SS pueden parecer extremadamente simples, las mismas poseen funciones notablemente complejas y versátiles. La variación entre las SS, además de determinar la elección de las rutas de tráfico, puede afectar la eficiencia de direccionamiento y translocación de las proteínas, la escisión (en caso de que corresponda), e incluso los eventos posteriores a la escisión de la señal (Liaci & Förster, 2021).

1.7 Uso de codones y su posible rol en la cinética de la vía SRP

Una de las características del código genético es su degeneración. Un mismo AA (a excepción de Met y Trp) puede ser codificado por distintos tripletes de nucleótidos, a los que se les llama codones sinónimos. Los codones sinónimos usualmente son leídos por distintos ARNts, que se denominan ARNts isoaceptores, aunque en ocasiones pueden utilizar el mismo ARNt. Inicialmente, se consideraba que los codones sinónimos tenían funciones equivalentes ya que codifican para el mismo aminoácido, de forma que al cambiar un codón por su sinónimo no se ve alterada la secuencia aminoacídica. Sin embargo, los codones sinónimos son utilizados con frecuencias no uniformes, existiendo una preferencia hacia un *set* específico de codones, fenómeno conocido como sesgo en el uso de codones. El mismo se observa a nivel de distintos organismos que presentan sesgos característicos, así como también entre genes de un mismo organismo e incluso a lo largo de un mismo gen (Grantham et al., 1980, 1981). El descubrimiento del sesgo en el uso de codones condujo a pensar que la elección de un codón sinónimo dado podría tener implicaciones funcionales,

además de codificar para su aminoácido, que confieran ventajas evolutivas, en vista de que la selección natural ha operado a favor del mantenimiento de este sesgo. Un codón puede definirse como óptimo o no óptimo dependiendo de la frecuencia con la que se pueda seleccionar su ARNt apropiado del conjunto citoplasmático de ARNt. En muchos organismos, el sesgo en el uso de codones está relacionado con sus poblaciones características de ARNt, de manera que los codones de uso frecuente para los que hay una mayor concentración de sus ARNt, serían traducidos más rápidamente que sus sinónimos menos frecuentes (Ikemura, 1981; Moriyama & Powell, 1997; Percudani et al., 1997). En general, los codones frecuentes suelen ser óptimos y los raros no óptimos. La disminución en la velocidad de elongación sobre codones no óptimos ha sido puesta en evidencia mediante el ensayo de incorporación de aminoácidos radiomarcados, demostrando que la identidad del codón podría afectar la tasa de elongación (Sørensen & Pedersen, 1991). También, mediante *ribosome profiling* se ha observado que los ribosomas pasan menos tiempo en codones óptimos (Hussmann et al., 2015; Weinberg et al., 2016). Varios autores han propuesto a los codones de uso poco frecuente como buenos candidatos para enlentecer la tasa de traducción (Chartier et al., 2012; Hanson & Collier, 2018; Komar, 2009; Pechmann et al., 2014; Pechmann & Frydman, 2013), y como se discutirá continuación, la presencia de estos elementos en *cis* en sitios claves del transcrito posiblemente se encuentre implicada en la regulación de la cinética de la vía de SRP.

1.7.1 Mutante de UreA en los codones 24 y 25

Recientemente, el grupo en el cual se llevó a cabo esta tesina generó un mutante de la proteína UreA en el cual los codones no óptimos 24 y 25 fueron sustituidos por sus sinónimos óptimos (generando el mutante *ureA2425*) (Sanguinetti et al., 2019). Los codones 24 y 25 codifican para AA localizados en el límite entre el segmento N-terminal de UreA y el primer TMD predicho. Estos codones no óptimos se encuentran conservados en 8 especies de *Aspergillus* cuyo uso de codones ha sido determinado (Sanguinetti et al., 2019), sugiriendo que podrían cumplir alguna función. La optimización de los codones 24 y 25 provoca un defecto en el transporte de urea y su análogo tóxico 2-tiourea (2-TU), también transportado por UreA, que se evidencia por el crecimiento defectuoso que presenta la cepa *ureA2425* en urea como única fuente de nitrógeno y su resistencia parcial a la 2-TU a 37 °C. En concordancia con el análisis de crecimiento en placa, *ureA2425* mostró una disminución en la tasa de captación de ¹⁴C-urea de aproximadamente un 50% con respecto a la cepa salvaje a 37 °C. Tomando en cuenta que tanto la versión salvaje como el mutante *ureA2425* de UreA se encuentran fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP), se analizaron los niveles de síntesis proteica por Western blot con un anticuerpo anti-GFP. De esta manera se observó que el mutante *ureA2425* crecido a 37 °C presenta una menor expresión de la proteína UreA en relación a la cepa salvaje. Algo similar se observó por microscopía de epifluorescencia, al detectar un bajo nivel de fluorescencia del transportador fusionado a GFP en el mutante *ureA2425* respecto a la cepa salvaje. En la cepa salvaje crecida tanto a 37 °C como a 25 °C, con una fuente de nitrógeno no represora, se observó la señal de UreA-GFP en la membrana plasmática, los septos y en vesículas y vacuolas (correspondiendo estas últimas al recambio proteico normal). En cambio, el mutante *ureA2425* crecido a 37 °C mostró una fluorescencia tenue tanto en la membrana como en

vesículas y vacuolas (Sanguinetti et al., 2019). La GFP es refractaria a la degradación (Chiang et al, 2001), por lo tanto al no constatarse una acumulación de señal en vesículas y vacuolas, se descarta que la disminución en los niveles de UreA se deba a una mayor degradación de UreA-GFP en la cepa mutante. Tampoco puede atribuirse lo observado a diferencias en los niveles o en la estructura del ARNm de *ureA* del mutante *ureA2425* con respecto a la cepa salvaje. Se propuso entonces que las diferencias puestas en evidencia podrían deberse a defectos a nivel de la síntesis proteica. Al crecer la cepa *ureA2425* a 25 °C, el fenotipo observado para el mutante 37 °C se revierte parcialmente (Sanguinetti et al., 2019).

Teniendo en cuenta que ha sido propuesto que el uso de codones influye en la velocidad de elongación y regula la eficiencia y precisión de la traducción (Y. Liu, 2020; Zhao et al., 2021), resulta razonable pensar que, en el caso de UreA los codones no óptimos 24 y 25 podrían establecer una pausa necesaria para la correcta expresión del transportador. Con la optimización de codones del mutante *ureA2425* esta pausa sería eliminada, acortando la ventana temporal con la que cuenta SRP para posicionarse en la salida del túnel ribosomal y reconocer la SS cuando ésta emerge del ribosoma. De esta forma, la deficiencia que presenta dicha cepa en el transporte de urea a 37 °C, podría deberse a alteraciones en la cinética de etapas tempranas de la traducción del transportador UreA, que resultarían en una disminución significativa de su síntesis. El trabajo proporciona evidencia *in vivo* de la importancia del par de codones raros 24 y 25 a nivel de la síntesis proteica del transportador de membrana UreA. Para comenzar a comprender el mecanismo de acción de la pausa que establecerían estos codones no óptimos durante la síntesis de UreA aún hay varias interrogantes. Una de ellas es cuál es la SS de UreA, que aún no ha sido determinada experimentalmente. El conocimiento de la SS y su posición en relación a los codones 24 y 25 son claves a la hora de proponer un modelo de la función de la pausa traduccional que causarían estos codones.

1.8 Predicción de la secuencia señal de UreA

A pesar de que para UreA no se han identificado por predictores bioinformáticos secuencias señal típicas (ver sección 1.6), sí se ha identificado la presencia de un trecho hidrofóbico de localización N-terminal, que comprende los AA 1 a 8 (Figura 6). Teniendo en cuenta que ha sido propuesto que en las PIMs tanto el primer segmento hidrofóbico como el primer TMD podrían actuar como SS, es la hipótesis de este trabajo que el trecho hidrofóbico de AA 1-8 podría ser reconocido por SRP, constituyendo la SS de UreA, y por lo tanto tener un rol clave en el direccionamiento de UreA hacia la membrana del RE.

MVAVIAAPDEAGVETVFTAPLTQGFYGIILGLGFAFALVMIFITWSLKRYQHEITSE

Verde: residuos sin carga hidrofóbicos

Rojo: residuos ácidos

Rosado: residuos básicos

— posible SS

— primer TMD predicho

24 25
— aa codificados por los codones 24 y 25

Figura 6. Análisis de la secuencia N-terminal de UreA. Primeros 50 aminoácidos de la proteína. Se indica la posible SS y la predicción del primer segmento transmembrana ([TMHMM Server, v. 2.0](#)). Se muestra el análisis de hidrofobicidad ([Peptide Hydrophobicity/Hydrophilicity Analysis Tool](#)).

Teniendo en cuenta la posición de estos primeros 8 AA en relación a los codones 24 y 25 (ver Figura 6), y que el túnel ribosomal alberga aproximadamente unos 30 aminoácidos en una conformación extendida (Etchells & Hartl, 2004), si los mismos formaran parte de la SS, resulta llamativo que el polipéptido naciente, de unos 23 AA de largo, aún no habría emergido del ribosoma en el momento en que los codones 24 y 25 disminuirían la velocidad de elongación. Con respecto a esto, ha sido reportada en la literatura la interacción del RNC con SRP aún cuando la SS no ha emergido del túnel ribosomal. Esto sugiere que la SS dentro del túnel ribosomal podría señalar a través del ribosoma, sin contactar directamente con SRP. Esto permitiría que SRP pueda posicionarse a la salida del túnel ribosomal y así mejorar la eficiencia de reconocimiento de la SS (Berndt et al., 2009). De esta forma, si bien la interacción de SRP con ribosomas en etapas tempranas de la traducción ha sido ya documentada, el rol que cumplirían los codones 24 y 25 del mensajero de UreA representa una novedad en cuanto al mecanismo de acción en eucariotas. Alternativamente, el primer TMD podría actuar como secuencia señal, pero en ese caso, la supuesta pausa impuesta por los codones 24 y 25 ocurriría antes de la traducción de esta secuencia y en consecuencia, cumpliría otro rol.

1.9 La proteína verde fluorescente

La proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* en inglés, GFP), originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria*, es un marcador muy utilizado para seguir la expresión génica y localización proteica en células vivas. Esta proteína tiene un fluorocromo que absorbe luz azul y ultravioleta, y emite luz verde de forma estable. Para su expresión, tanto en procariontes como en eucariotes, no se requieren sustratos o cofactores exógenos, por lo que, las células vivas pueden ser observadas con una perturbación mínima (Chalfie et al., 1994). Desde su descubrimiento se han creado distintas variantes mejoradas que resuelven problemas tales como la dimerización de la proteína, el *photobleaching* y el plegamiento en ambientes celulares adversos. Una de ellas, es msGFP2, una versión monomérica y con un super plegamiento con respecto a la GFP original, lo que le permite

plegarse eficientemente en condiciones adversas. Esta versión presenta mayor estabilidad al *photobleaching* de la señal, es menos propensa a perturbar las funciones de las proteínas a las que se encuentre asociada, y presenta citotoxicidad reducida. Estas características, vuelven a msGFP2 una de las mejores versiones de GFP disponibles para el *tagging* de proteínas (Valbuena et al., 2020). En este trabajo se utiliza GFP como *tag* para seguir mediante microscopía de epifluorescencia la localización subcelular de transportador UreA, y se generan herramientas que permitirán validar la posible SS utilizando a msGFP2 como proteína reportera.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo contribuir a la determinación de la SS del transportador de membrana UreA.

2.2 Objetivos específicos

- **Determinar si el tramo N-terminal de UreA compuesto por los AA 2 a 7 actúa como SS de la proteína.** Para ello se plantean las siguientes actividades.
 - Generación la construcción *ureA Δ 2-7::gfp::pyrGAF* mediante Fusión-PCR**
Esta construcción porta la delección de los AA 2 a 7 de UreA, además de la proteína GFP fusionada a UreA. Esto permite observar el efecto de la delección en la localización subcelular del transportador mediante microscopía de fluorescencia. La construcción incluye al marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*, que complementa la mutación *pyrG89* de la cepa receptora, la cual genera la auxotrofia a la uridina y uracilo de la cepa.
 - Transformación de una cepa de *A. nidulans* con la construcción realizada en el punto anterior**
El diseño de la construcción incluye regiones 5'UTR y 3'UTR que presentan homología en el *locus ureA*, de forma que las mismas puedan incorporarse al genoma de la cepa receptora mediante recombinación homóloga.
 - Análisis de los transformantes generados en el punto anterior**
Mediante ensayos de crecimiento en placa, microscopía de epifluorescencia y Western Blot.
- **Evaluar el potencial de la proteína msGFP2 como reportera para la verificación de la SS.** Para ello se plantean las siguientes actividades.
 - Generación de las construcciones *PgpdA_mini-msGFP2-ter_crgA_AF* y *PgpdA_1000-msGFP2-ter_crgA_AF*, y clonado en el plásmido pZero_blunt/pabaA**
PgpdA es el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* que codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual posee una expresión constitutiva. *PgpdA_1000* corresponde a una versión del promotor con el que se obtiene una alta expresión, mientras que *PgpdA_mini* es un fragmento del promotor, con el que se obtiene una expresión menor. La construcción lleva el terminador del gen *crgA* de *A. fumigatus*. La generación de estas construcciones permitirá en una segunda etapa verificar la capacidad de distintas secuencias N-terminales de UreA fusionadas, para dirigir a msGFP2 a la membrana plasmática. De este modo se podrá confirmar el rol de posibles SS de UreA.

-Transformación de una cepa de *A. nidulans* con los plásmidos generados

-Análisis de los transformantes

Mediante ensayos de crecimiento en placa y microscopía de epifluorescencia. Se verificará si la expresión de msGFP2 bajo ambos promotores resulta perjudicial para *A. nidulans*.

3. Materiales y Métodos

3.1 *Aspergillus nidulans*

3.1.1 Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo
MVD001	<i>wt pabaA1</i>
MVD10A	<i>ureA::gfp::pyrGAf pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB</i>
MVD13A	<i>ΔureA::riboB riboB2 pyroA1 pyrG89 ΔnkuA::argB</i>
MVD17	<i>ΔureA::riboB riboB2 pyroA4 pabaA1 (riboB2)</i>
MVD117	<i>pantoB100 biA2</i>

3.1.1.1 Descripción de los genotipos y fenotipos

- *ureA::gfp* es el gen que codifica para el transportador UreA de *A. nidulans* fusionado a *gfp* (gen que codifica para la proteína verde fluorescente).
- *pabaA1* es el alelo responsable de la auxotrofia para el ácido p-aminobenzoico (paba).
- *pyrG89* es el alelo responsable de la auxotrofia para la uridina y el uracilo (U y U).
- *pyrGAF* es el gen *Aspergillus fumigatus* que complementa la auxotrofia provocada por el alelo *pyrG89*.
- *pyroA4* es el alelo responsable de la auxotrofia para la piridoxina (pyro).
- *riboB2* es un alelo del gen *riboB* que provoca la auxotrofia por la riboflavina (ribo).
- *pantoB100* es el alelo responsable de la auxotrofia por el pantotenato.
- *biA2* es el alelo responsable de la auxotrofia por la biotina.
- *ΔnkuA::argB* es la delección por sustitución de la secuencia codificante del gen *nkuA* por el gen *argB* (codifica para la ornitil carbamil transferasa, la cual cataliza la conversión de ornitina a citrulina, un precursor de la arginina). El gen *nkuA* es esencial para la recombinación no homóloga del ADN en la reparación de roturas de doble cadena, y, por tanto, se minimiza la frecuencia de este tipo de recombinación. De esta forma, se favorece la doble recombinación homóloga, que tiene como resultado la integración del fragmento de interés en el locus *ureA*. En las cepas *ΔnkuA*, aproximadamente 90% de los transformantes llevan una integración homóloga única. (Szewczyk et al., 2006).
- *ΔureA::riboB* es la sustitución de la secuencia codificante del gen *ureA* por el gen *riboB*, que complementa la auxotrofia provocada por el alelo *riboB2*.

Las cepas MVD001, MVD117 fueron utilizadas como controles a la hora de confirmar las auxotrofias de cepas receptoras y transformantes.

3.1.2 Medios y condiciones de cultivo

Medio Mínimo (MM):

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

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6,8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121 °C durante 15-20 minutos. Este medio debe completarse con una fuente de nitrógeno y los suplementos nutricionales correspondientes, según las auxotrofias de cada cepa. Puede utilizarse líquido, o bien sólido agregando 1,3 % de agar.

Medio completo (MC):

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

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6,8 y se esteriliza mediante calor húmedo a 121 °C durante 15-20 minutos. Puede utilizarse líquido, o bien sólido agregando 1,3% de agar.

Solución de Sales:

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

Se lleva a un litro con agua destilada y se esteriliza mediante calor húmedo a 121 °C durante 15-20 minutos. Se guarda 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.

Solución de elementos traza:

40 mg borato de sodio decahidratado
40 mg sulfato de cobre pentahidratado

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

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

Suplementos nutricionales:

- Riboflavina (ribo), vitamina B2 requerida para la respiración celular.
- Piridoxina (pyro), vitamina B6 requerida para la síntesis de AA y lípidos.
- Ácido p-aminobenzoico (paba), intermediario de síntesis del folato.
- Pantotenato (panto), vitamina B5 requerida para el metabolismo de los ácidos grasos, el metabolismo de los carbohidratos y el ciclo del ácido tricarbónico.
- Biotina (bio), vitamina B7 involucrada en el metabolismo de ácidos grasos y AA.
- Tartrato de amonio, fuente de nitrógeno.
- Nitrato, fuente de nitrógeno no represora.

Los suplementos se preparan como soluciones 100X (a excepción de la uridina y uracilo, la cual se prepara como solución 50X) , se esterilizan por calor húmedo y se conservan a 4 °C. La urea y la 2-tiourea se esterilizan por filtración.

Suplemento	Concentración de la solución stock (100X)
Riboflavina	25 mg/100 mL
Piridoxina HCL	500 mg/100 mL
Ácido p-aminobenzoico	9,2 g/ 100 mL
D-Pantotenato	20 mg/100 mL
D-Biotina	10 mg/100 mL
Tartrato de amonio	9,2 g/100 mL
Nitrato de sodio	0,85 g/100 mL
Uracilo	61 mg/mL
Uridina	56 mg/mL
Urea	3,03 g /100 mL
2-Tiourea	3,81 g /100 mL

3.2 Técnicas empleadas con *A. nidulans*

3.2.1 Transformación de *A. nidulans*

La construcción *ureAΔ2-7::gfp::pyrGAF* fue utilizada para transformar la cepa MVD13A. Dicha construcción, cuenta con regiones 5' y 3' con homología a 5' y 3' UTRs del *locus*

ureA, por lo que puede integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga (Figura 7).

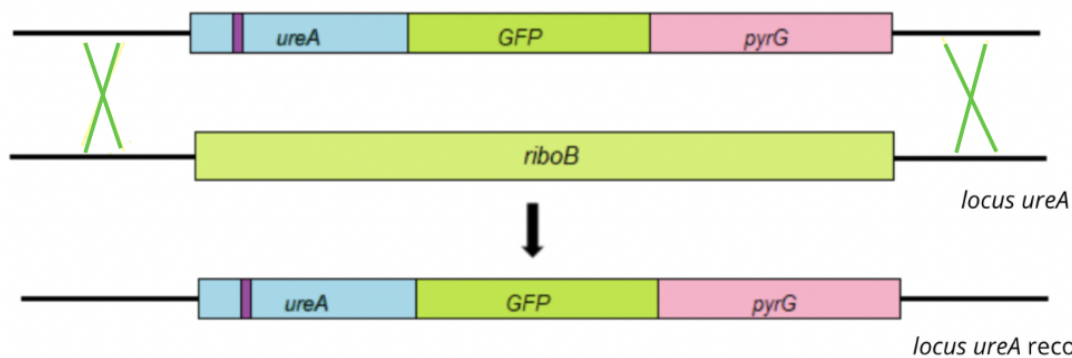


Figura 7. Esquema de la integración de la construcción *ureAΔ2-7::gfp::pyrGAF* en el locus *ureA* mediante recombinación homóloga.

3.2.1.1 Generación de protoplastos

En este paso se generaron células competentes, que pueden incorporar la molécula de ADN a transformar. Para esto, se generaron células sin pared celular, conocidas como protoplastos.

El día previo a la transformación se inocularon 400 mL de MM con los suplementos necesarios con una suspensión de esporas, generada a partir de 2 placas de la cepa en cuestión crecidas de manera confluyente, en 15 mL de Tween 80 (0.01%). Se incubó de 11 a 12 horas a 30 °C con agitación fuerte (140 r.p.m). Se observó al microscopio, y se detuvo la incubación cuando las esporas comienzan a germinar. Para obtener una buena cantidad de protoplastos es muy importante que el cultivo sea joven. El cultivo se filtró sobre blutex, se lava el micelio con agua estéril y seca entre hojas de papel estériles. El micelio seco se pesó por diferencia en un falcon estéril y se resuspendió en solución B, a razón de 10 mL/g de micelio. Se mezcló con vortex para favorecer la actividad de las enzimas. Se transfirió a matraz estéril y se agregó la enzima comercial GLUCANEX® (Sigma-Aldrich) a razón de 400 mg/g de micelio. Se añadieron 3 a 7 mg de albúmina de suero bovino (BSA) por g de micelio y se incubó con agitación suave (100 rpm) a 30 °C durante 2-2.5 horas. La formación de protoplastos se siguió al microscopio. La suspensión de protoplastos se transfirió a tubos Corex® estériles, se vortexeó suavemente y se agregó lentamente por las paredes del tubo un volumen igual de solución D. Los tubos deben mantenerse en hielo. Se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm (en rotor vasculante de 142 mm de radio, poner freno 0 en todas las centrifugaciones) a 14 °C. Los protoplastos forman una capa blanca en la interfase que se transfirió con pipeta Pasteur a otro tubo Corex® estéril. Los protoplastos recuperados fueron lavados agregando 5-10 mL de solución E y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Los protoplastos se resuspendieron en 5 mL de solución G, se realizó el recuento de los mismos en célula de Thoma, y luego se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm. Una vez finalizada la centrifugación se resuspendieron los protoplastos en solución G de forma de obtener una concentración de 2-5 x10⁷ protoplastos/100 μL.

3.2.1.2 Transformación

En este paso los protoplastos generados en el punto anterior incorporan la molécula de ADN de interés, para el caso de la construcción *ureAΔ2-7::gfp::pyrGAF* se transformó con no menos de 250 ng de la misma (previamente purificada) y para el caso de los plásmidos se transformó con 4 μg.

Antes de comenzar, se vortexeó y calentó la solución PEG (en baño de agua a aprox. 50 °C) para resuspender cualquier precipitado de PEG, ya que el PEG luego de un tiempo a temperatura ambiente precipita. A 100 μL de suspensión de protoplastos, se le agregó el ADN (no menos de 250 ng totales) en un volumen menor a 15 μL de Buffer TE y preferiblemente en menos de 10 μL. Se vortexeó 6-8 veces por 1 segundo a máxima velocidad. Se agregaron 50 μL de Solución de PEG recién filtrada a temperatura ambiente. Se vortexeó 3-4 veces por 1 segundo a máxima velocidad, y se dejó en hielo durante 25 minutos. A continuación se agregó 1 mL de solución de PEG a temperatura ambiente recién filtrada, y se mezcló resuspendiendo con micropipeta 10 veces. Se dejó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Si la transformación es exitosa, protoplastos fusionados pueden ser observados en la mezcla de transformación. Luego se plaqueó la mezcla de transformación en placas de selección, que deben estar bien secas. Para placas de Petri de 100 mm de diámetro, se utilizaron 115 μL de mezcla de transformación. Las placas se incubaron inicialmente *overnight* boca arriba a 30 °C o 37 °C. Al otro día las placas fueron invertidas. Luego de una incubación inicial a 30 °C, durante la cual se forman las paredes celulares, las placas pueden ser transferidas a 37 °C. La producción de esporas por las colonias transformantes son generalmente visibles al tercer día.

-Soluciones de Transformación:

B: 1,2 M MgSO₄, 10 mM fosfato (pH 5,8)

D: 0,6 M Sorbitol, 100 mM Tris Cl (pH 7,5). Se esterilizó por autoclave.

E: 1 M Sorbitol, 10 mM Tris Cl (pH 7,5). Se esterilizó por autoclave.

G: 0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂. Se esterilizó por autoclave.

PEG: 0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂, 75 mM PEG (25% w/v). Se esterilizó por autoclave y se filtró antes de usar.

Placas para la transformación con la construcción *ureAΔ2-7::gfp::pyrGAF*:

-Placas de selección: MM 1,3 %, NH₄, ribo, pyro. En estas placas solo pueden crecer los transformantes, que han recuperado la capacidad de síntesis de uridina y uracilo (U y U), al incorporar a su genoma el marcador de selección *pyrGAF*.

-Placas control negativo: MM 1,3 %, NH₄, ribo, pyro. Se inocularon protoplastos que han pasado por el protocolo de transformación sin agregarles ADN a transformar. Como no se suplementa el medio con U y U, la cepa receptora no debería crecer.

-Placas control de viabilidad: MM 1,3 %, NH₄, pyro, U y U. Se inocularon protoplastos que han pasado por el protocolo de transformación sin agregarles ADN a transformar, verificando que los mismos son viables luego del protocolo. El medio cuenta con los suplementos nutricionales para que crezca la cepa receptora.

Placas para la transformación con las plásmidos Pmini y Pmil:

-Placas de selección: MM 1,3 %, NH₄, pyro. En estas placas solo pueden crecer los transformantes, que han recuperado la capacidad de síntesis de paba, al incorporar a su genoma el marcador de selección *pabaA*.

-Placas control negativo: MM 1,3 %, NH₄, pyro. Se inocularon protoplastos que han pasado por el protocolo de transformación sin agregarles ADN a transformar. Como no se suplementa el medio con paba, la cepa receptora no debería crecer.

-Placas control de viabilidad: MM 1,3 %, NH₄, pyro, paba. Se inocularon protoplastos que han pasado por el protocolo de transformación sin agregarles ADN a transformar, verificando que los mismos son viables luego del protocolo. El medio cuenta con los suplementos nutricionales para que crezca la cepa receptora.

3.2.1.3 Purificación de los transformantes

Durante el proceso de transformación, la pared celular es removida para generar protoplastos, que pueden fusionarse durante el proceso de transformación, generando transformantes heterocariontes. Es decir, que pueden tener núcleos que han integrado la construcción de interés, y otros que no han sido transformados. Dado que las esporas son uninucleadas, a partir de éstas se pueden purificar colonias homocariontes que porten la construcción de interés.

Se tomaron esporas de colonias de los transformantes resultantes del paso anterior, eligiendo aquellas que se encuentren lo más aisladas posibles y se realizó una suspensión en detergente Tween® 80 (Sigma-Aldrich) 0,01%. La suspensión se realiza en detergente porque las esporas son altamente hidrofóbicas. Se realizó una dilución 1/200 de la suspensión, de la cual se inocularon 80 µL en las placas de selección, distribuyendo homogéneamente por toda la placa, y se incubó en estufa a 37 °C durante 24-48 horas.

3.2.2 Crecimiento en placa

Este ensayo se realiza para analizar el fenotipo de los transformantes. A partir de los transformantes purificados se realiza una placa madre en la cual se colocan de forma ordenada una elección de réplicas de transformantes, la cepa receptora (MVD13A), y una cepa control (MVD001). A partir de la placa madre, se realizan réplicas en placas en las que se omite el agregado de suplementos requeridos por las cepas uno a uno, para verificar sus auxotrofías. Por otro lado se analiza el crecimiento en distintas concentraciones de urea y tiourea. En las placas con 2-TU se agregó nitrato (NO₃) como fuente de nitrógeno, ya que

no es una fuente represora de la expresión de UreA. Las placas se incubaron durante 2 días a 37 °C.

3.2.3 Microscopía de epifluorescencia

Las cepas se crecieron directamente en *glass bottom dishes* (GBD) esteriles en MM 0,1 % glucosa líquido, suplementado con prolina (5 mM) como fuente de nitrógeno y los suplementos requeridos por casa cepa. Previamente se crecieron las cepas en MC 1,3%, se realizó una suspensión de esporas en Tween 0,01 % de la cual se inocularon 3 μ L en el MM 0,1% glucosa. Se incubó a 25 °C durante 14-16 horas. Previo a la observación se realizaron 3 lavados con MM 0,1% Glucosa con fosfato y prolina para quitar la riboflavina del medio (ya que presenta autofluorescencia). Las muestras fueron observadas y fotografiadas con el microscopio invertido Olympus CKX31 perteneciente a la Plataforma de Microscopía del Institut Pasteur de Montevideo con un filtro U-MNIBA3. El microscopio está equipado con una cámara Hamamatsu Orca Er y usa el software *Micro-Manager/ImageJ* (<https://micro-manager.org/>) para procesamiento de imágenes.

MM 0,1% glucosa

Se prepara con solución de sales sin fosfato. No se ajusta pH. Se le agrega NaH_2PO_4 en polvo a una concentración final de 25 mM antes de usar.

3.3 Técnicas empleadas con *Escherichia coli*

3.3.1 Transformación

Se agregaron no más de 50 ng de plásmido (en un volumen menor al 10 % del volumen de células) a células de *E. coli* quimiocompetentes y se deja 30 minutos en hielo. En este caso, se agregaron 5 μ L de mezcla de ligación en 50 μ L de células. Una vez pasados los 30 minutos se incubó 90 segundos a 42 °C (o 120 segundos a 37°C). Luego de este paso se incubó nuevamente en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se agregaron 4 volúmenes de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación (200 r.p.m). Se plaquearon 100 μ L en medio LB con el antibiótico adecuado. Al resto del volumen se le dio un *spin*, se descartó un poco de sobrenadante, se resuspendieron las células en ~100 μ L y se plaqueó todo el volumen en medio LB con antibiótico. Se incubó por 16 a 24 horas en estufa a 37 °C.

Medio LB:

5 g de extracto de levadura

10 g triptona

10 g NaCl

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta a pH 7 y se esteriliza. El medio puede utilizarse líquido o sólido. Para el último se agrega 1,5 % agar. Los antibióticos utilizados fueron kanamicina y ampicilina, los cuales se agregaron al medio en una concentración final de 50 μ g/mL.

3.4 Técnicas de estudio de ácidos nucleicos

3.4.1 PCR

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se utilizó en todos los casos la ADN polimerasa KAPA HiFi (Roche), esta polimerasa tiene la característica de poseer alta fidelidad. En este trabajo, basado en la introducción de una mutación, es importante que los transformantes solo posean la mutación de interés, y no otras adicionales en la secuencia codificante de *ureA*. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L, utilizando la concentración de reactivos sugerida por el fabricante.

3.4.1.1 Fusion-PCR

La técnica Fusion-PCR (Szewczyk et al., 2006) permite la fusión de distintos fragmentos de ADN lineales que pueden ser utilizados para transformación e integración en el genoma de forma rápida y sencilla en comparación con los métodos de clonado convencionales. Es una técnica versátil, que permite el diseño de fragmentos de ADN de interés, que reemplacen las regiones del genoma a modificar.

La generación la construcción *ureA Δ 2-7::gfp::pyrGAF* consistió de dos rondas de PCR consecutivas, en las que se utilizaron 3 pares de primers. En la primera ronda, a partir ADN genómico de la cepa MVD10A, se generaron dos fragmentos de ADN parcialmente solapantes, que contienen la modificación en la delección de los 21 nucleótidos que codifican los aminoácidos 2 a 7 del gen *ureA* (Figura 7). Los fragmentos generados en la primera ronda se utilizaron como molde en una segunda PCR en la que se obtuvo la construcción de interés (Figura 8).



Figura 8. Representación esquemática de las reacciones de Fusion-PCR para la construcción *ureA Δ 2-7::gfp::pyrGAF*. P1 y P2 son los *primers* que amplifican el fragmento 5' mientras que P3 y P4 los *primers* que amplifican el fragmento 3'. P2 y P3 portan una "cola" violeta representativa de la delección, la cual se marca con el mismo color en el esquema de la construcción. P5 y P6 representan los *nested primers*. En la primera ronda se generan los fragmentos f1 y f2. En la segunda ronda los fragmentos f1 y f2 con regiones complementarias entre sí se fusionan y la fusión resultante es amplificada utilizando los *nested primers* P5 y P6.

De forma análoga, se obtuvieron los *cassettes* *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF* y *PgpdA1000-msGFP2-ter_crgA_AF* (Figura 9). Para lograr estas construcciones se fusionaron 3 fragmentos de ADN. En este caso, los *nested primers* agregaron un sitio de corte de enzimas de restricción a cada lado del fragmento, NotI hacia el 5' y XbaI hacia el 3'. El molde utilizado fue ADN plasmídico para amplificar *msGFP2* y *cgrA*, y ADN genómico para amplificar *PgpdA*.

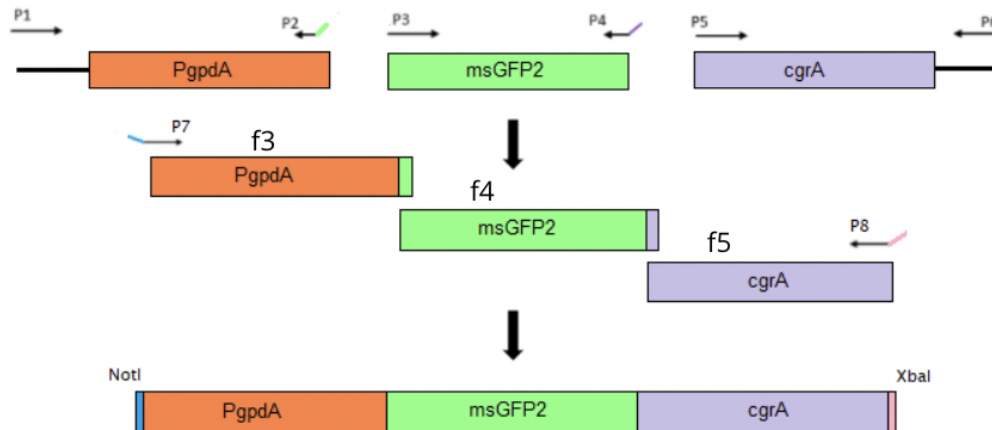


Figura 9. Representación esquemática de las reacciones de Fusión-PCR para generar las construcciones *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF* y *PgpdA1000-msGFP2-ter_crgA_AF*. P1 y P2 son los *primers* que amplifican al promotor, P3 y P4 amplifican la secuencia codificante de *gfp* y P5 y P6 amplifican la secuencia del terminador. Tanto P2 como P4 introducen al fragmento que amplifican homología con el siguiente fragmento, permitiendo la fusión. P7 y P8 son los *nested primers*, que introducen sitios de restricción de las enzimas XbaI y NotI. En la primera ronda se generan los fragmentos f3, f4 y f5. En la segunda ronda los fragmentos f3, f4 y f5 se fusionan utilizando los *nested primers*.

3.4.1.1.1 Amplificaciones

Construcción *ureAΔ2-7::gfp::pyrGAF*

-Primera ronda:

Los *primers* utilizados fueron URE5-F y UREAΔ2-7-R para f1, UREAΔ2-7-F y URE3-F para f2.

Reacción PCR

5 μL buffer KAPA-HiFi (5x)

0,5 μL KAPA-HiFi (1U/μL)

0,75 μL *primer* Fw (10 μM)

Programa

Etapas inicial 95 °C por 3'

Desnaturalización 98 °C por 20" *

Annealing 61 °C por 15" *

0,75 μ L <i>primer</i> Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 1'30" para f1/ 6' para f2*
0,75 μ L dNTPs (10 mM)	*25 ciclos
500 ng ADN genómico	Etapas final 5 minutos a 72 °C
c.s.p 25 μ L H ₂ O	

-Segunda ronda:

Se realizaron 10 ciclos en los que los fragmentos se fusionan, y luego 15 ciclos en los que se aumentó 20 segundos por ciclo el tiempo de extensión, en los que el fragmento fue amplificado. Los *primers* utilizados fueron URE5N y URE3N.

Reacción Fusion-PCR	Programa
5 μ L buffer KAPA-HiFi (5x)	Etapas inicial 95 °C por 2'
0,5 μ L KAPA-HiFi (1U/ μ L)	Desnaturalización 98 °C por 20" *
1 μ L <i>primer</i> Fw (10 μ M)	Annealing 61 °C por 15" *
1 μ L <i>primer</i> Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 4' *
0,75 μ L dNTPs (10 mM)	*10 ciclos
~25 ng f1	*15 ciclos \uparrow 20" /ciclo
~25 ng f2	Etapas final 5 minutos a 72 °C
c.s.p 25 H ₂ O	

Construcciones *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF* y *PgpdA1000-msGFP-ter_crgA_AF*

-Primera ronda:

La diferencia entre ambas construcciones es la versión del promotor que porta cada una. Con el fin de generar estas dos versiones se generaron dos primers, correspondientes a P1 en la figura 8, complementarios a distintas regiones del promotor, dando lugar a su versión casi completa que permite una alta expresión constitutiva, o mini con la que se induce una expresión constitutiva más baja. Los primers utilizados fueron PgpdA1000F/ PgpdAminiF y PgpdA-msGFP2R para generar f3, msGFP2F y msGFP2-tercrgAR para f4, y tercrgAF y

pFW9.3R para f5. Los ADN molde utilizados fueron ADN genómico de la cepa MVD10A para f3, ADN plasmídico conteniendo msGFP2 para f4 y *crgA* para f5.

Reacción PCR	Programa
5 μ L buffer KAPA-HiFi (5x)	Etapa inicial 95 °C por 3'
0,5 μ L KAPA-HiFi (1 U/ μ L)	Desnaturalización 98 °C por 20'' *
0,75 μ L <i>primer</i> Fw (10 μ M)	Annealing 61 °C por 15'' *
0,75 μ L <i>primer</i> Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 1'*
0,75 μ L dNTPs (10 mM)	*25 ciclos
500 ng ADN genómico para f3, 10 ng ADN plasmídico para f4 y f5	Etapa final 5 minutos a 72 °C
c.s.p 25 μ L H ₂ O	

-Segunda ronda:

Los *primers* utilizados fueron NotI-*PgpdA1000F* y XbaI-*tercrgAR* para obtener la construcción *PgpdA1000-msGFP-ter_crgA_AF* y NotI-*PgpdA-F* y XbaI-*tercrgA-R* para obtener la construcción *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF*.

Reacción Fusion-PCR	Programa
5 μ L buffer KAPA-HiFi (5x)	Etapa inicial 95 °C por 2'
0,5 μ L KAPA-HiFi (1 U/ μ L)	Desnaturalización 98 °C por 20'' *
1 μ L <i>primer</i> Fw (10 μ M)	Annealing 61 °C por 15'' *
1 μ L <i>primer</i> Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 4' *
0,75 μ L dNTPs (10 mM)	*10 ciclos
~25 ng f3	*15 ciclos \uparrow 20'' /ciclo
~25 ng f4	Etapa final 5 minutos a 72 °C
~25 ng f5	

c.s.p 25 μ L H₂O

3.4.1.2 PCR para secuenciación

Previo a la secuenciación se amplificó el *locus ureA*, utilizando los *primers* PureAF y gfpRv. Se utilizó como molde el ADN genómico extraído y purificado de un transformante con las auxotrofias esperadas seleccionado al azar (ver secciones 3.4.2.1 y 3.4.3).

Reacción PCR	Programa
5 μ L buffer KAPA-HiFi (5x)	Etapla inicial 95 °C por 2'
0,5 μ L KAPA-HiFi (1 U/ μ L)	Desnaturalización 98 °C por 20" *
1 μ L <i>primer</i> Fw (10 μ M)	Annealing 61 °C por 15" *
1 μ L <i>primer</i> Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 4' *
0,75 μ L dNTPs (10 mM)	*30 ciclos
500 ng ADN genómico	Etapla final 5 minutos a 72 °C
c.s.p 25 μ L H ₂ O	

3.4.1.3 PCR colonia de *Escherichia coli*

Para realizar un primer *screening* de los transformantes obtenidos, se realizó una PCR colonia. La elección de los *primers* se realizó de forma que la amplificación con los mismos, demostrara que los plásmidos contienen el inserto de interés: *PgpdA*seq que hibrida con el promotor *PgpdA* tanto en la versión mil como en la mini, y msGFP2Rev que hibrida con msGFP2.

Partiendo de colonias aisladas en placas, se realizaron suspensiones picando las colonias en 10 μ L de agua estéril. Se utilizó 1 μ L de estas suspensiones como molde para la PCR.

Reacción PCR	Programa
2,5 μ L buffer HighTaq (10X)	Etapla inicial 94 °C por 2'
0,25 μ L HiTaq (1U/ μ L)	Desnaturalización 94 °C por 10" *
0,75 μ L <i>primer</i> Fw (10 μ M)	Annealing 58 °C por 20" *

0,75 μ L primer Rv (10 μ M)	Extensión a 72 °C por 1' *
0,5 μ L dNTPs (10 mM)	*30 ciclos
1 μ L suspensión colonia	Etapa final 5 minutos a 72 °C
c.s.p 25 μ L H ₂ O	

3.4.1.4 Primers

URE5-F	GAAACCTGGAGCAGTCGAAG
UreA Δ 2-7-R	CATTTTGGATAACCGAAGAA
UreA Δ 2-7-F	TTCTTCGGTTATCCAAAATGCCCGATGAAGCCGGGGTAGAGAC
URE3-R	CCCGATTTCTGAGACAAGGA
URE5N	GCGTGGCTGCTGTTCAACAGTTACC
URE3N	GCGTGGCTGCTGTTCAACAGTTACC
PureA-F	GCGTGGCTGCTGTTCAACAGTTACC
GFP-R	TTTGTATAGTTCATCCATGC
PgpdA1000-F	GACTTCAGCAACATCTCCTG
PgpdA-msGFP2-R	GACTTCAGCAACATCTCCTG
msGFP2-F	ATGGATAGCACTGAGAGCCTGTTC
msGFP2-tercgrA-R	GAGAGAGATTCTTCTGCTGTTTAAGAACCGCCACTGCCTCCAG
TercgrA-F	ACAGCAGAAGAATCTCTCTCC
pFW9.3-R	CGAAAGGGCCTCGTGATACG
NotI-PgpdA-F	TTTGTATAGTTCATCCATGC
NotI-PgpdA1000-F	AATGCGGCCGCGGTTGACCGGTGCCTGGATC
XbaI-tercgrA-R	CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC
PgpdA-seq	CACTCTAGAGCATGATTCATGACGTATATTCACC
msGFP2-R	TTAAGAACCGCCACTGCCTCCAG

3.4.2 Extracción de ácidos nucleicos

3.4.2.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN se crecieron las cepas en MC con 3% agar. Las esporas colectadas por cada placa se resuspendieron en 7,5 mL de Tween 80 0,01% y se inocularon

200 mL de MM líquido con los suplementos necesarios. Se incubó *overnight* a 37 °C con agitación a 140 rpm, y luego se filtró el cultivo sobre blutex, lavando el micelio con agua estéril y secándolo bien entre hojas de papel. El micelio se congeló con nitrógeno líquido y fue molido con mortero hasta obtener un polvo blanco. Se agregaron 800 µL de solución de extracción de ADN por cada 200 mg de micelio molido y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. El ADN se extrajo primero con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se vortexeó bien y se centrifugó a 11600 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa (unos 600 µL) y se extrajo con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se vortexeó bien y se centrifugó nuevamente a 11 600 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa (unos 400 µL) y se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% en presencia de 0.3 M de acetato de sodio (AcNa). Se incubó por 30-60 min a -20°C y se centrifugó por 10 minutos a 11600 g. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 1 mL EtOH 70% (se agregó el EtOH 70%, se invirtió el tubo, se centrifugó a 11600 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante). Se secó el precipitado debajo de una lámpara durante 10 minutos y se resuspendió en 50-100 µL de buffer Tris-EDTA (suplementado con RNAsa a una concentración final de 10 µg/mL). Finalmente se incubó durante 1 hora en baño de agua a 37 °C.

3.4.2.2 Minipreparación de ADN plasmídico

Para extraer plásmidos se seleccionó una colonia aislada, se inoculó en 3 mL de medio LB + el antibiótico adecuado, y se incubó *overnight* a 37°C con agitación a 140 rpm. Se traspasó todo el volumen a un tubo eppendorf, se centrifugó por 30 segundos y se descartó el sobrenadante (repetir hasta terminar los 3 mL). Se resuspendió con pipeta en 200 µL de Solución I, se agregaron 5 µL de ARNasa 10 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Luego se agregaron 200 µL de Solución II recién preparada y se mezcló suavemente por inversión, sin dejar que pase mucho tiempo en esta solución. Se agregaron 200 µL de Solución III fría, se mezcló bien por inversión y se dejó 5 minutos en hielo. A continuación se agregaron 200 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se vortexeó bien. Luego se centrifugó 15 minutos a 12000 g y se tomó el sobrenadante (aproximadamente 400-500 µL). Se precipitó con 1 volumen de isopropanol mezclando por inversión y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 minutos a 12000 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 500 µL de EtOH 70% invirtiendo varias veces, se centrifugó por 5 minutos a 12000 g y se descartó el sobrenadante. Por último se dejó secar bajo una lámpara por no más de 10 minutos. Se resuspendió en 50 µL de TE pH 8 y se almacenó a -20 °C.

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

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

Solución III: 3 M AcK; 11,5 % ácido acético glacial. Esta solución debe estar fría por lo que se recomienda preparar 50 mL (14,7 g de AcK + 5,75 mL AcH glacial, llevar a 50 mL con H₂O mQ) y guardar en la heladera.

3.4.3 Purificación de productos de PCR

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

-Purificación directa: el producto de la reacción de amplificación fue purificado mediante el kit comercial Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit. Este fue el método de elección utilizado en los casos en que luego de la amplificación se obtuvieron productos únicos, visualizados por electroforesis en gel de agarosa como una banda única del tamaño esperado.

-Purificación por gel de agarosa: las bandas de tamaño esperado fueron escindidas del gel de agarosa y purificadas utilizando el kit comercial Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs®). Este fue el método de purificación de elección en los casos en los cuales la amplificación tuvo como resultado más de un producto de PCR, visualizados como varias bandas en un gel de agarosa de tamaños distintos al esperado para el fragmento de interés.

3.4.4 Visualización de ADN

Los ADN genómicos, productos de PCR, de extracciones, productos de restricción con enzimas de restricción y de fragmentos purificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% u 0,8%, dependiendo el tamaño del fragmento de ADN a resolver. Las corridas se realizaron en buffer TAE 1X. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™) (Figura 10). Los gels fueron teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific™), que permite la visualización del ADN bajo luz ultravioleta.

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

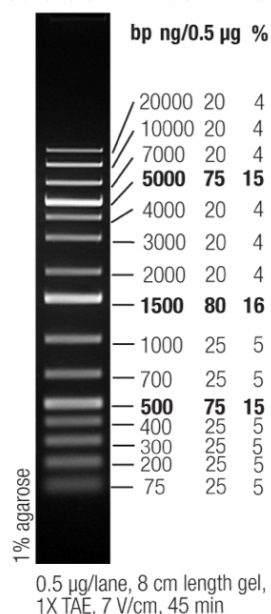


Figura 10. Marcador de peso molecular utilizado.

TAE 50X:

Tris Base 2M

Ácido acético glacial 1M

EDTA 0,05 M pH 8,0

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

Buffer de carga ADN (6X):

30% (v/v) glycerol

0,25% (w/v) azul de bromofenol

0,25% (w/v) xileno cianol

3.4.5 Cuantificación de ADN

Todas las cuantificaciones se realizaron en el espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

3.4.6 Clonado y subclonado

3.4.6.1 Vectores utilizados

-pJet1.2 blunt cloning (Thermo)

El vector pJET1.2/blunt (Figura 11) es un plásmido lineal que permite la ligación de fragmentos de ADN con extremos romos, como pueden ser los productos de PCR generados por ADN polimerasas. Estos fragmentos se pueden ligar directamente al vector en cuestión de minutos. Este vector fue utilizado para clonar y secuenciar las construcciones *PgpdA1000-msGFP-ter_crgA_AF* y *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF*. Para la selección de transformantes contiene el gen de la enzima de restricción letal (*eco47IR*) que se interrumpe cuando se incorpora un inserto en el sitio múltiple de clonado, de forma que si el vector se circulariza pero sin incorporar un inserto, este gen se expresa, resultando letal para *E. coli*. Esta selección positiva acelera drásticamente el proceso de selección de colonias y elimina los costos adicionales necesarios para otros tipos de selección. Además, para promover que las bacterias mantengan el plásmido, contiene el gen que codifica para una beta lactamasa (*bla*) que les confiere a los transformantes resistencia a ampicilina (Ap^R).

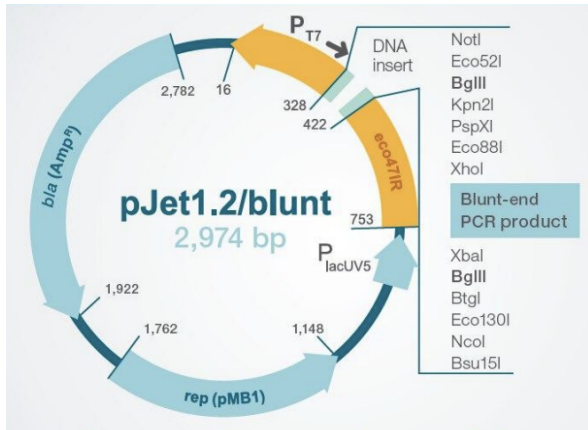


Figura 11. Esquema del vector pJet1.2/blunt.

- pZero blunt/pabaA

Este vector, generado previamente por el grupo, se utilizó para subclonar las construcciones *PgpdA1000-msGFP-ter_crgA_AF* y *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF*, y transformar *A. nidulans*. Este vector contiene el gen *pabaA* de *A. nidulans* en el sitio de policlonado del vector pZero_blunt (Invitrogen) (Figura 12). Este gen complementa la mutación *pabaA1* de la cepa receptora MVD17. Para la selección en bacterias contiene genes que le confiere resistencia a kanamicina y neomicina.

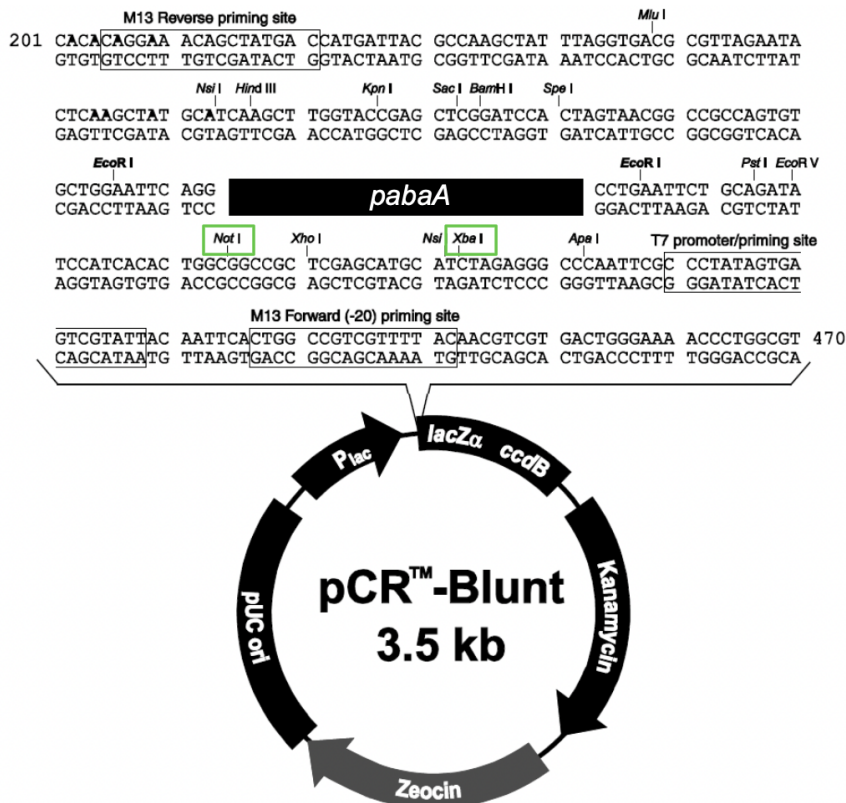


Figura 12. Esquema del vector pZero_blunt/pabaA. Se indican los sitios de corte de las enzimas NotI y XbaI que fueron utilizados para subclonar las construcciones Fmini y Fmil.

3.4.6.2 Ligación

Para el clonado de las construcciones *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF* (Fmini) y *PgpdA1000-msGFP-ter_crgA_AF* (Fmil), en el vector pJET1.2/blunt se utilizó el ClonJet PCR Cloning kit, utilizando una relación inserto plásmido 5:1, incubando el mix a 22 °C durante 30 minutos. Se obtuvieron así los vectores Pmini y Pmil.

Reacción de ligación f mil	Reacción de ligación f mini
5 μ L buffer de reacción 2x	5 μ L buffer de reacción 2x
85 ng Fmil	70 ng Fmini
25 ng pJET1.2/blunt	25 ng pJET1.2/blunt
1 U T ₄ ADN ligasa	1 U T ₄ ADN ligasa
2,3 μ L H ₂ O mQ	3 μ L H ₂ O mQ

Para el subclonado de las construcciones en el vector pZero_blunt/pabaA, previamente se digirieron las construcciones y vector con las enzimas NotI y XbaI (ver sección 7.4), se utilizó una relación inserto vector 5:1, el mix se incubó durante toda la noche a 16 °C, y finalmente se inactivó la ligasa incubando 10 minutos a 65 °C. Se utilizó la ligasa T4 (New England BioLabs®).

3.4.6.3 Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción

Este paso se realizó para verificar la presencia del inserto en los plásmidos, previo a su secuenciación y transformación en *A. nidulans*. Se realizó luego de la extracción de ácidos nucleicos (ver sección 3.4.2.2). Las digestiones se realizaron utilizando 1 unidad enzimática por μ g de ADN. Se incubó durante 1 hora a 37°C en el caso de las enzimas NotI y XbaI (FastDigest, Thermo) y se dejó toda la noche a la misma temperatura para el caso de *XhoI* (Invitrogen).

3.4.7 Secuenciación

Para verificar que los transformantes de *A. nidulans* (se seleccionó 1 transformante al azar) tienen efectivamente la construcción de interés, sin ninguna mutación extra en la secuencia codificante de *ureA*, se amplificó el *locus* de interés (ver sección 3.4.1.2) utilizando los *primers* PureAF y gfpRv, se purificó el amplicón (ver sección 3.4.3) y se envió a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación.

3.4.7.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias recibidas fueron analizadas a través de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), alineando las con la secuencia de la región genómica de *A. nidulans* de referencia.

3.5 Técnicas de estudio de proteínas

3.5.1 Extracción de proteínas

Se crecieron las cepas en MC con 3% agar, se colectaron las esporas en 7,5 mL de 0,01% Tween® 80 (Sigma-Aldrich) y se inocularon en 200 mL de MM líquido con los suplementos correspondientes. Se incubó durante la noche a 37 °C con agitación a 140 rpm. El micelio se filtró en blutex enjuagando con agua estéril. Luego de secar el micelio entre hojas de papel, se lisaron las células, moliendo el micelio en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo blanco. Se colectaron ~200-300 μ L de micelio molido en un eppendorf de 2 mL, y se resuspendieron en el buffer de precipitación, vortexeando 10-20 segundos. Para ayudar a la resuspensión, se pipeteó unas 10 veces (mínimo) con pipeta automática p1000. Luego se incubó en hielo durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugó otros 10 minutos a 4 °C a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 1 mL EtOH 100% helado, prestando especial atención a la resuspensión: usando una pipeta p1000, primero se rompieron los agregados de micelio con la punta del tip sellada por quemado y posteriormente se resuspendió, pipeteando arriba y abajo varias veces con una pipeta p200, hasta que no se observaron más agregados de micelio. Se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y 13000 rpm. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con 1 mL de acetona helada, buscando resuspender bien, repitiendo el procedimiento utilizado en el lavado con EtOH 100% (estos pasos de resuspensión son fundamentales para recuperar la mayor cantidad de proteína posible). Se removió el sobrenadante y se secó el pellet al aire a 60 °C durante 30-40 minutos o hasta que este se tornara de un color blancuzco y se comenzaran a formar grietas. Luego, se disolvió el pellet en 400-500 μ L de buffer de extracción. Nuevamente en este paso se debe prestar especial atención en obtener una resuspensión homogénea, resuspendiendo unas cuantas veces con una pipeta automática p1000 y luego otras tantas con una p200. Se incubó durante 15 minutos en hielo y se centrifugó otros 15 minutos a 4 °C y 13000 rpm. Por último, se tomó el sobrenadante y se traspasó a un tubo Eppendorf nuevo.

Composición de buffers:

Buffer de Precipitación:

50 mM Tris-HCl pH 8,0.

50 mM NaCl

12.5 % TCA

Buffer de Extracción:

100 mM Tris-HCl pH 8.0

50 mM NaCl

1% SDS

1 mM EDTA

Inhibidores de proteasas SIGMA para hongos dilución 1:500 (se agrega inmediatamente antes de usar).

3.5.2 Cuantificación de proteínas

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

Se realizaron diluciones 1:10 de los extractos proteicos en agua para hacer las medidas. El blanco se realizó con agua. Se realizó la curva de calibración con BSA (0, 0.025, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5 y 2 mg/mL).

Se cargaron 25 μL de cada cada muestra por triplicado en una placa de ELISA, y luego se agregaron 200 μL de working reagent. Se agitó durante 30 segundos en agitador orbital y se incubó a 37 °C durante 30 minutos, cubriendo la placa con aluminio. Por último, se dejó que la placa alcance temperatura ambiente y se realizaron las medidas de absorbancia a 562 nm.

3.5.3 SDS-PAGE

La calidad del extracto proteico fue verificada por medio de SDS-PAGE al 12 %. Se sembraron 50 μg de proteína y el gel fue revelado utilizando azul de Coomassie.

Soluciones:

Gel de separación:

Acrilamida/Bis-acrilamida	3,00 mL
4X Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,875 mL
H ₂ O mQ	2,625 mL
Persulfato de Amonio 10%	25 μL
TEMED	5 μL

Gel de *stacking*:

Acrilamida/Bis-acrilamida	325 μL
4X Tris-Cl/SDS pH 6.8	625 μL
H ₂ O mQ	1,525 mL
Persulfato de Amonio 10%	12,5 μL
TEMED	2,5 μL

3.5.4 Western Blot

SDS-PAGE

Se mezcló la alícuota de proteína con buffer de carga con SDS y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se cargaron 50 µg del extracto total. Se corrió en un gel SDS-PAGE al 10% hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga llegue a la parte inferior del gel.

Transferencia

Al finalizar el SDS-PAGE, se midieron las dimensiones del gel, y se pasó a un recipiente con buffer de transferencia (con SDS) frío. Se cortó una membrana del tamaño del gel y 12 hojas de papel Whatman un poco más grandes que la membrana, agrupadas de a 6. Se sumergió todo en buffer de transferencia (con SDS) frío. Se armó el dispositivo de transferencia y se transfirió durante 1 hora a 120 V.

Revelado con anticuerpo anti-GFP

Se incubó la membrana con el anticuerpo anti-GFP generado en ratón (Roche) (1:2500 en 3% BSA en TBST). Se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBST. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) diluido en solución de bloqueo. Se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBST. Se reveló utilizando el kit de revelado por quimioluminiscencia (Invitrogen) en G-BOX.

Stripping

Se incubó la membrana con stripping buffer durante 30 minutos a 55-60 °C en horno de hibridación (con leve agitación). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBST y se dejó la membrana durante la noche en 50 mL de Solución de Bloqueo a 4 °C.

Revelado con anticuerpo anti-tubulina

Se realizó de la misma forma que la incubación con anti-GFP, pero con el anticuerpo anti-tubulina generado en ratón (DSHB) (1:1000 en solución de bloqueo).

Soluciones:

SDS Loading buffer (4X) (buffer de carga):

250 mM Tris-HCl pH6,8
12% SDS
40 % glicerol
20 % β-mercaptoetanol (se le agrega a la alícuota)
0.02 % Azul de bromofenol

Buffer de transferencia (1 litro - dejar en heladera):

Tris Base 3.02 g
Glicina 14.42 g
H₂O mRo c.s.p. 200 mL

Agregar 200 mL de EtOH y completar con H₂O mRo hasta 996,3 mL. Antes de usar, se agrega 3,7 mL de SDS 10%.

Stripping Buffer:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 para 2,5 mL - 1 M Tris-HCl pH 6,8 para 40 mL

2% SDS – 8 mL 10% - SDS para 40 mL

100 mM β -Mercaptoetanol (se agrega en el momento) – 280 μ L para 40 mL.

TBST (Buffer de Lavado):

20 mM Tris-HCl pH 7.5 – 20 mL 1 M Tris-HCl pH 7,5 para 1 L

150 mM NaCl – 30 mL NaCl 5 M para 1 L

0,1% Tween 20 – 1 mL Tween 20 para 1 L.

Solución de bloqueo:

5% leche descremada en polvo disuelta en TBST

4. Resultados y discusión

4.1 Generación de construcciones por Fusion-PCR

Para la generación del mutante *ureA* Δ 2-7 y de las construcciones *PgpdA_1000::msGFP2::ter_cgrA_AF* (Fmil) y *PgpdA_mini::msGFP2::ter_cgrA_AF* (Fmini) se utilizó la técnica Fusion-PCR (ver 3.4.1.1). Los resultados de la primera ronda de amplificación realizada para generar las 3 construcciones, en la cual se amplificaron los fragmentos que las componen: (f1 y f2 para la construcción *ureA* Δ 2-7::*gfp*::*pyrGAF* (Δ 2-7); f3, f4 y f5 para las construcciones Fmil y Fmini, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 13).

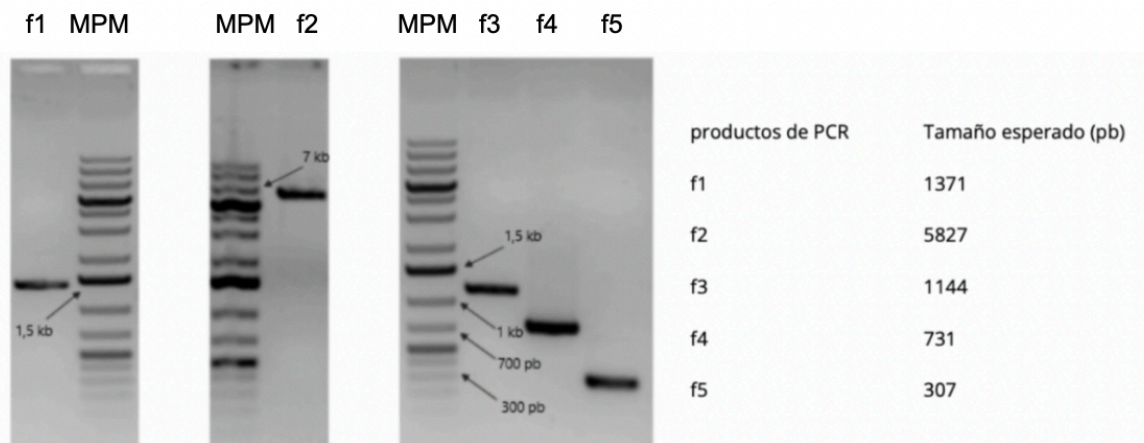


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de los productos de la primera ronda de PCRs (3 μ l de carga). Cada gel con su respectivo marcador de peso molecular (MPM GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 4 μ l). La tabla indica el tamaño esperado para cada producto de PCR.

Se lograron amplificar todos los fragmentos. En la amplificación de f2 se observa una tenue banda de mayor peso molecular que correspondería a una amplificación inespecífica. Para el resto de los fragmentos, en todos los casos las bandas se corresponden con el tamaño de amplicón esperado. Para continuar con el siguiente paso de la técnica, los fragmentos fueron purificados por gel (ver 3.4.3) para quitar los *primers* que podrían interferir en la reacción de fusión. Luego de la purificación se realizó la segunda ronda de amplificación (ver 3.4.1.1). El resultado de las fusiones fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 14).

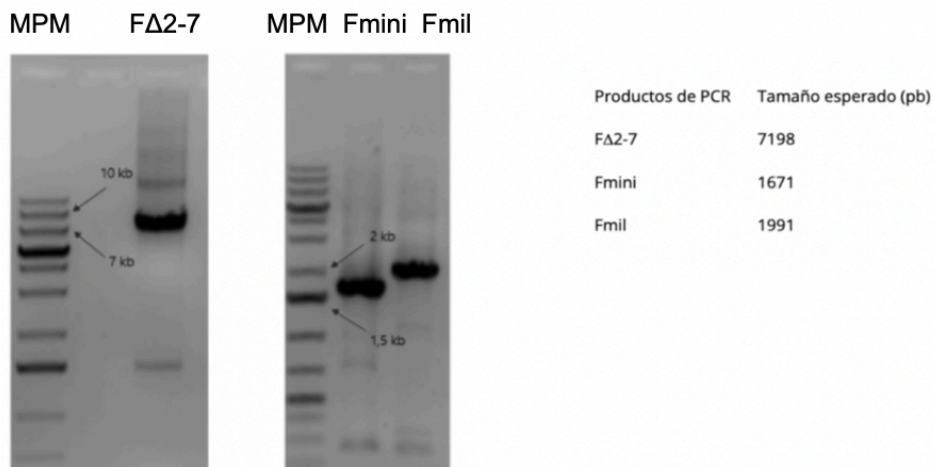


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% para el análisis de las fusiones: FΔ2-7 (fusión de los fragmentos f1 y f2, utilizando los primers *Ure5N* y *Ure3N*), Fmini (fusión de los fragmentos f3, f4 y f5 utilizando los primers *NotI PgpdA-F* y *XbaI-tercrgA-R*), Fmil (fusión de los fragmentos f3, f4 y f5 utilizando los primers *NotI PgpdA1000-F* y *XbaI-tercrgA-R*). Se sembraron 3 μ L de cada fusión y 4 μ L de MPM GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder). La tabla indica el tamaño esperado para cada producto de PCR.

Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para las 3 fusiones. Dada la ausencia de un único producto de PCR, la purificación de las construcciones se realizó mediante purificación por gel. Una vez purificados los fragmentos se corroboró que la purificación había sido exitosa mediante otra corrida electroforética en gel de agarosa 1% (Figura 15).

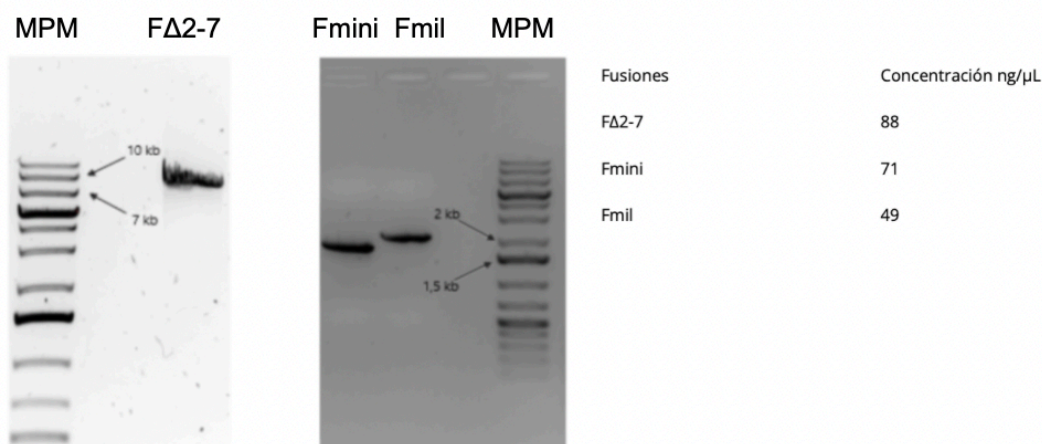


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1%, realizada para corroborar la purificación de las fusiones. Se sembraron 3 μ L de cada purificación y 4 μ L de MPM (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder). En la tabla se indica la concentración de cada fusión.

4.2 Transformación de la cepa MVD13A con la construcción $\Delta 2-7$

Una vez obtenida la fusión F $\Delta 2-7$, la misma se transformó en la cepa MVD13A (ver 3.2.1). Durante la transformación con la construcción $\Delta 2-7$, en el locus *ureA* se reemplazó el gen *riboB* por *ureA $\Delta 2-7$::gfp::pyrGAF*, y de esta forma, los transformantes ya no pueden crecer en un medio sin riboflavina. Por otro lado, como la construcción F $\Delta 2-7$ contiene el gen *pyrGAF* que complementa la mutación *pyrG89*, de forma que los transformantes adquieren la capacidad de crecer en medios sin uridina y uracilo. En consecuencia, los transformantes fueron seleccionados en base a su capacidad de crecer en ausencia de uridina y uracilo. Se eligieron cinco transformantes para ser purificados. Este paso es importante, ya que durante la transformación se remueve la pared celular para generar los protoplastos, que pueden fusionarse generando transformantes heterocariontes. Para la purificación se realizó una suspensión de esporas que se plaquea en medio selectivo (con riboflavina y piridoxina, pero sin uridina y uracilo). Las colonias que crecen en estas condiciones a partir de esporas son mutantes homocariontes. Entonces, el fenotipo observado es un reflejo del genotipo determinado por el material genético de los núcleos que han incorporado la construcción F $\Delta 2-7$ en el locus *ureA*. Previo a la secuenciación del locus *ureA*, se verificó que los transformantes tuvieran las auxotrofias esperadas, mediante ensayos de crecimiento en placa. De los cinco transformantes purificados, se eligió uno al azar (denominado transformante *ureA $\Delta 2-7$*) para secuenciar el locus *ureA*.

4.3 Secuenciación del locus *ureA* del transformante *ureA $\Delta 2-7$*

Con el fin de corroborar que el transformante tuviera la mutación de interés y ninguna otra en el locus *ureA*, se realizó una extracción de ADN genómico, que fue utilizado como molde para amplificar por PCR el locus *ureA*. El producto de PCR fue purificado por gel y enviado a secuenciar a la empresa Macrogen. Se confirmó que el transformante porta la mutación de interés, y que el resto de su secuencia presenta 100% de homología con el genoma de referencia.

4.4 Análisis de crecimiento en placa transformante *ureA $\Delta 2-7$*

Una vez confirmado que el transformante lleva la mutación de interés, se realizaron análisis de crecimiento en placa, con el fin de observar el fenotipo asociado a la delección de los AA 2 a 7 del transportador UreA. En este ensayo se evaluó la capacidad del mutante *ureA $\Delta 2-7$* de crecer con urea como única fuente de nitrógeno así como también su resistencia a tiourea. De esta forma, es posible evaluar si la delección de los AA 2 a 7 permite la síntesis y funcionalidad normales de UreA, o si por el contrario lleva a un defecto de las mismas. Como control, se utilizaron una cepa salvaje para *ureA* (*ureA wt*, MVD001) y una cepa con el gen *ureA* deletado (Δ *ureA*, MVD13A, cepa receptora de la transformación), de esta forma, fue posible comparar el fenotipo del mutante *ureA $\Delta 2-7$* con respecto al funcionamiento normal del transportador UreA, así como también con respecto a su pérdida de función. Las cepas se crecieron en MM sólido con los suplementos según las necesidades de cada cepa, en presencia de distintas concentraciones de urea y tiourea (Figura 16). Como la

tiourea no puede utilizarse como fuente de nitrógeno, se agregó nitrato como fuente de nitrógeno no represora.

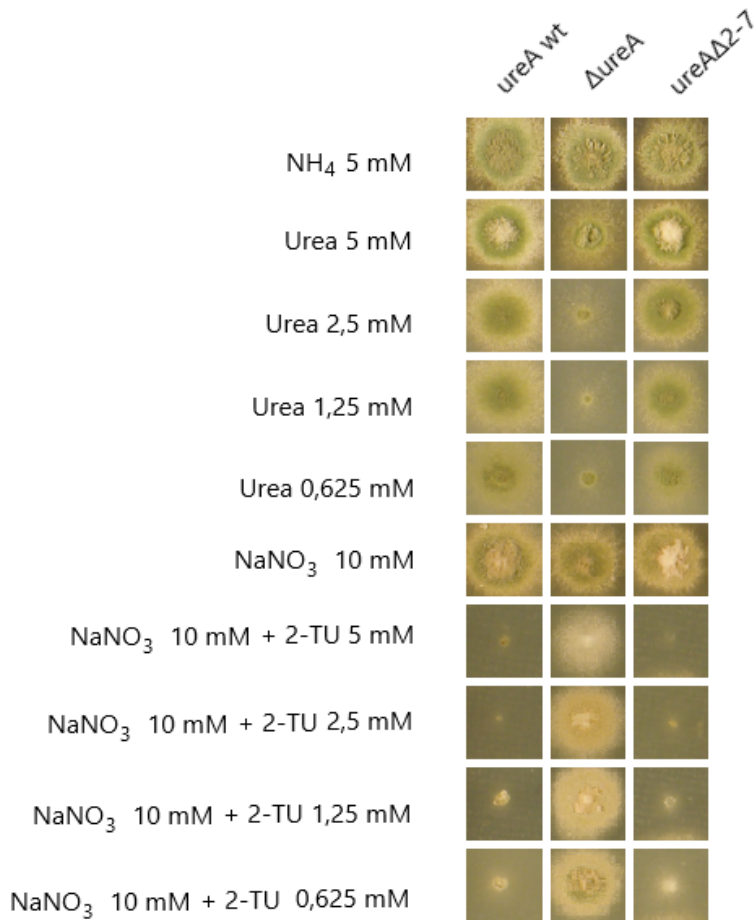


Figura 16. Ensayos de crecimiento en placa a 37°C de la cepa transformante *ureA* $\Delta 2-7$, *ureA wt* (MVD001) y $\Delta ureA$ (MVD13A). Éstas se cultivaron por 48 horas en amonio y sobre diferentes concentraciones de urea y el análogo tóxico 2-tiourea (en este caso se utilizó 10 mM nitrato de sodio, NaNO₃, como fuente de nitrógeno) con los suplementos correspondientes.

Mediante los ensayos de crecimiento en placa se observó que el mutante *ureA* $\Delta 2-7$ tiene un fenotipo muy similar al de la cepa salvaje, tanto en su crecimiento en urea como en tiourea. Esto indicaría que el transportador es funcional, y por lo tanto se expresa a nivel de la membrana plasmática, donde posibilita el crecimiento de la cepa con urea como única fuente de nitrógeno a todas las concentraciones ensayadas. A su vez, realiza el transporte hacia el interior celular de tiourea, que por ser tóxica para *A. nidulans*, inhibe el crecimiento de las cepas. Por el contrario, en el caso de la cepa $\Delta ureA$, se observó un crecimiento residual con urea como única fuente de nitrógeno, siendo éste mayor a las concentraciones más altas de urea. Este crecimiento es posible por la difusión pasiva de la fuente nitrogenada a través de la membrana. La cepa $\Delta ureA$ creció en las distintas concentraciones de tiourea ensayadas, indicando que tampoco hay transporte activo de tiourea. Al igual que la urea, la tiourea difunde de forma pasiva a través de la membrana de forma dependiente de la concentración, y se observa a mayores concentraciones de tiourea una leve disminución del crecimiento de la cepa.

4.5 Análisis de niveles de síntesis proteica mediante Western blot del transformante *ureAΔ2-7*

Para determinar si la delección de los AA 2 a 7 de UreA tuvo efecto a nivel de la síntesis proteica del transportador, se analizaron los niveles de UreA Δ 2-7-GFP en extractos proteicos del transformante mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-GFP (Figura 17). Se realizó una extracción de proteínas totales de la cepa mutante y de la cepa MVD10A (esta porta la fusión *ureA::gfp* salvaje) como control. Se cuantificaron las proteínas mediante el método BCA, y se realizó un Western blot (ver 3.5.4).

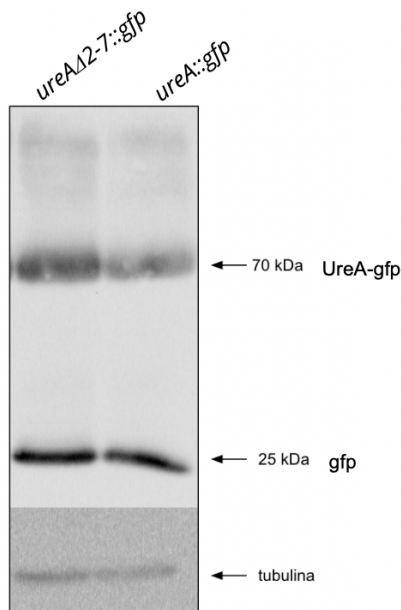


Figura 17. Revelado de Western blot a partir de extractos proteicos de las cepas MVD10A (*ureA::gfp*), y mutante *ureAΔ2-7* (*ureAΔ2-7::gfp*) con anticuerpo anti-GFP y anticuerpo anti-tubulina como control de carga. Se sembró 100 μ g de proteína.

Al revelar la membrana de Western blot con el anticuerpo anti-GFP, se visualizaron dos bandas bien definidas, que se ubican a las alturas correspondientes a los pesos aproximados de 70 kDa y 25 kDa. La banda que se sitúa alrededor de los 70 kDa corresponde a la fusión UreA-GFP (Sanguinetti et al., 2014, 2019), y se observa que la misma no presenta diferencias en cuanto a su intensidad al comparar los carriles correspondientes a la cepa control y la cepa *ureAΔ2-7*. Esto indicaría que la delección de los AA 2 a 7 del transportador no estaría interfiriendo con los niveles de síntesis del mismo. Es importante tener presente que mediante este ensayo se mide el total de la proteína, sin considerar su localización subcelular, por lo que la señal no corresponde únicamente al transportador localizado en la membrana plasmática. La ausencia de diferencias en la cantidad de proteína sintetizada se corresponde con el fenotipo observado mediante ensayos de crecimiento en placa, en los cuales el mutante *ureAΔ2-7* demostró un fenotipo igual al salvaje. Por otro lado, la banda que se localiza en torno a los 25 kDa corresponde a la GFP libre. La GFP es refractaria a la proteólisis (Chiang et al., 2001) y por este motivo, la misma puede ser detectada aún cuando la proteína fusionada a ella sea degradada. La degradación de UreA-GFP es producto del recambio proteico normal de la célula, de forma que diferencias en la intensidad de la banda situada alrededor de los 25 kDa indicarían

diferencias a nivel de la degradación de la proteína. Como se observa en la Figura 16 la cepa control y *ureA* Δ 2-7 no presentan diferencias en la cantidad de GFP libre, lo que sugiere que la delección en el mutante no produce un aumento de la degradación del transportador.

4.6 Determinación de la localización subcelular mediante microscopía de epifluorescencia

Con el fin de evaluar el efecto de la delección de los AA 2 a 7 en la localización subcelular del transportador, se analizó el mutante *ureA* Δ 2-7 mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 18).

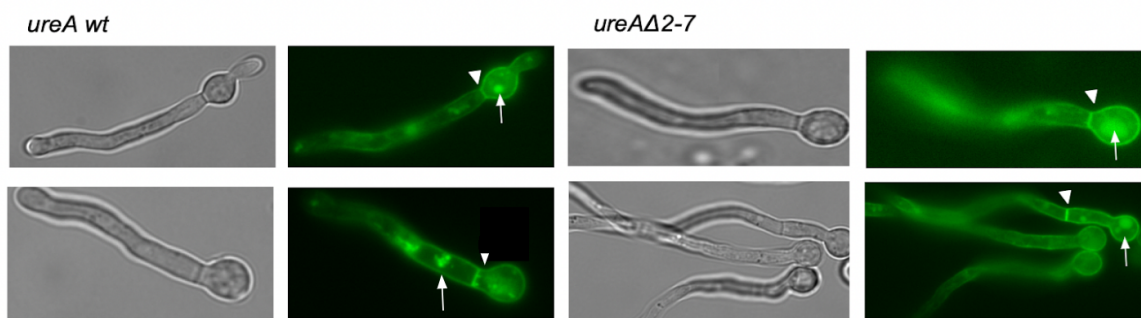


Figura 18. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de las cepas *ureA* Δ 2-7 y *ureA wt* (MVD10A). Con cabezas de flechas se marcan los septos, y con flechas las vacuolas. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 100X. Como control de autofluorescencia se utilizó la cepa MVD001 (no mostrado). A la izquierda de cada imagen de fluorescencia se muestra la imagen de campo claro correspondiente.

Tanto en la cepa salvaje como en el mutante *ureA* Δ 2-7 se observa la señal en la membrana plasmática y septos (localización característica de los transportadores de membrana de *A. nidulans*). Esto indicaría que la delección del trecho 2 a 7 de AA hidrofóbicos del transportador no afecta el direccionamiento de UreA hacia la membrana plasmática. Este resultado concuerda con lo observado en el ensayo de crecimiento en placa, en el cual el mutante *ureA* Δ 2-7 no mostró diferencias de crecimiento en medios con distintas concentraciones de urea como única fuente de nitrógeno con respecto al *wt*, ni en su sensibilidad a la 2-TU. La señal de GFP también se observa en gránulos citoplasmáticos, que corresponderían a vesículas de la vía secretoria (que llevan al transportador desde el RE hacia la membrana plasmática), y a vacuolas, donde ocurre la degradación proteica del transportador, producto del recambio proteico natural de las células. La cepa salvaje y el mutante *ureA* Δ 2-7 no presentan diferencias notorias en cuanto al nivel de señal localizada en vacuolas, lo que indicaría que la mutación no produce efectos a nivel de la degradación de UreA. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Western blot, donde ambas cepas, salvaje y mutante, presentaron una señal correspondiente a GFP libre muy similar.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que el trecho de AA hidrofóbicos 2-7 en la región N-terminal no serían necesarios para la correcta síntesis del transportador UreA, y por lo tanto no parecerían formar parte de la SS de esta proteína

integral de membrana. El efecto claro que se esperaría observar al eliminar una SS, es un defecto en la síntesis ya sea que la proteína no se lograra expresar, se lograra expresar en menor medida, o bien se logre expresar pero no pueda alcanzar su localización celular adecuada, y por lo tanto, no pueda cumplir su función adecuadamente. Por otro lado, si recordamos, una de las características de las SS es la variación que éstas presentan, atributo que se relaciona de forma inmediata con la capacidad de SRP de reconocer y unir a la variedad de SS existentes. En este sentido, es razonable pensar que si la región deletada formara parte de la SS, tras su ausencia, SRP podría reconocer, y guiar el direccionamiento a la membrana del RE a través del siguiente trecho de AA hidrofóbicos, que en el caso de UreA corresponde al primer segmento transmembrana. En línea con este razonamiento, un trabajo llegó a mostrar que el 20% de secuencias hidrofóbicas generadas en forma aleatoria fueron capaces de reemplazar la secuencia de secreción de la invertasa en *S. cerevisiae* (Kaiser et al., 1987) entonces, resulta también probable que el primer TMD podría en este caso actuar como señal (Hegde & Keenan, 2021). Con esto en mente, con los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible aseverar que el trecho de AA 2 a 7 constituya la única SS funcional de UreA.

Teniendo en cuenta las dificultades a la hora de identificar una SS dada la enorme variedad de SS que pueden existir, el otro objetivo de este trabajo consistió en la validación del uso de la proteína msGFP2 como reportera para la identificación de posibles SS (mediante su capacidad de dirigir a msGFP2 al RE, al fusionarse estas SS al N-terminal de esta proteína reportera. A continuación, se describen las etapas realizadas y los resultados respecto a este objetivo.

4.7 Clonado de Fmini y Fmil en el vector pJET

A diferencia de la construcción F Δ 2-7, que fue transformada en *A. nidulans* como producto de PCR purificado, Fmini y Fmil (ver sección 4.1) se transformarán como parte de un plásmido que porta el marcador de selección *pabaA*. Para esto, Fmini y Fmil inicialmente fueron clonados en el vector comercial pJET. Se realizó la ligación de los fragmentos al vector según las instrucciones del fabricante y posteriormente se transformaron células *E.coli* DH5 α por shock térmico (ver 3.3.1). Para la selección de transformantes, pJET tiene un gen letal interrumpido por el sitio de clonado, de forma que solo crecerán las bacterias que hayan incorporado plásmidos con el inserto. Además, pJET confiere a las células resistencia a ampicilina, por lo que la selección de transformantes se realizó en placas LB con este antibiótico. Se seleccionaron 4 colonias resistentes a ampicilina para cada ligación, y se realizaron minipreparaciones para extraer el ADN plasmídico (Figura 19).

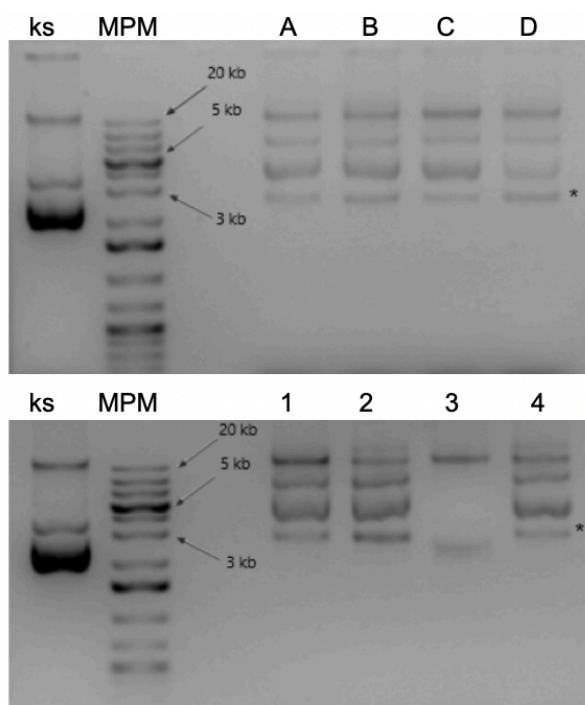


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1%, de minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de colonias obtenidas de la transformación con las distintas ligaciones. En la parte superior, los carriles A-D corresponden a los plásmidos en los que fue clonada la construcción Fmini (Pmini), en la parte inferior, los carriles 1-4 corresponden a los plásmidos en los que fue clonada la construcción Fmil (Pmil). Se utilizó como control negativo el vector KS de 3 kb (peso molecular similar al vector pJET sin inserto).

Como se observa en la Figura 19, al comparar la migración los plásmidos extraídos con la migración del plásmido control (que posee un tamaño similar al pJET sin inserto) se observa que todas presentan un retardo en la migración, lo que sugiere que han incorporado las construcciones. Para todos los carriles, salvo el 3 de la parte inferior, se observan las 3 formas características de los plásmidos, circular relajado, lineal, y superenrollado como forma mayoritaria. Además, se observa una banda de menor peso molecular, indicada con un asterisco en la Figura 19 que podría corresponder a ADN circular simple hebra, que se observó también en las digestiones con enzimas de restricción (ver Figura 20), y también luego de tratar los plásmidos con RNAsa. Para descartar que la presencia de dicha banda de menor peso molecular se deba a algún problema de la minipreparación “casera”, la extracción de ADN plasmídico se repitió utilizando un kit comercial, obteniéndose los mismos resultados.

Para verificar que los plásmidos tienen los insertos de interés se seleccionaron 2 plásmidos de cada construcción para ser analizados por enzimas de restricción (Figura 20). Conociendo la secuencia del vector pJET y la de las construcciones Fmini y Fmil es posible predecir el patrón de bandas esperado en las digestiones para las construcciones que incorporaron el inserto. El clonado en pJET no es direccional, por lo tanto, el patrón de digestión dependerá del sentido en el que los plásmidos hayan incorporado el inserto (Figura 20).

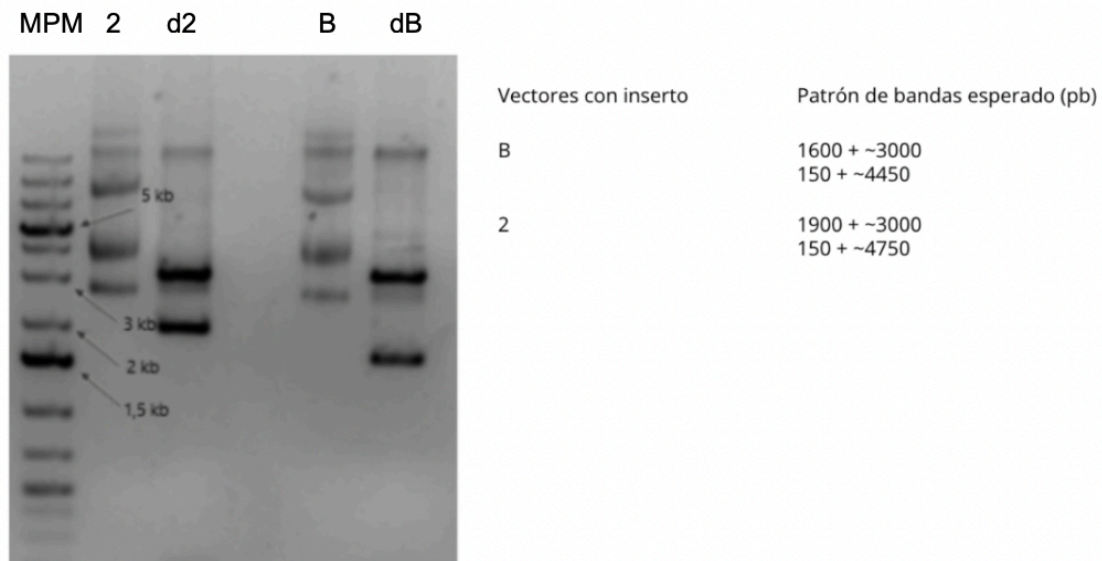


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Se muestran los resultados de la digestión (d2 y dB) con la enzima de restricción XhoI de los plásmidos 2 y B. En la tabla se muestran el patrón de bandas esperado (según el sentido en que se hayan insertado las construcciones) para los vectores que han incorporado el inserto al ser digeridos con XhoI.

El resultado de la digestión con XhoI indica que ambos plásmidos tienen las construcciones. En el caso del plásmido 2 se observan las bandas esperadas de 1900 y 3000 pb, y en el caso del plásmido B 1600 y 3000 pb. También se analizaron por restricción los plásmidos 1 y A, y se observó que los mismos incorporaron los insertos, pero en ambos casos orientado en el sentido opuesto respecto a los plásmidos 2 y B respectivamente. En este caso, el patrón de digestión no resultó tan evidente, dado que se esperaba una banda muy pequeña, de aproximadamente 150 pb y por lo tanto difícil de visualizar en un gel de agarosa 1% (datos no mostrado). Para corroborar que los insertos pueden ser liberados, utilizando las enzimas NotI y XbaI (las cuales serán utilizadas para el posterior subclonado en el vector pZero_blunt/pabaA, ver más adelante) se realizó la digestión con estas enzimas. El resultado de la digestión se muestra en la Figura 21, donde se ve que en ambos casos se liberan insertos, cuyos tamaños se corresponden con el tamaño esperado.

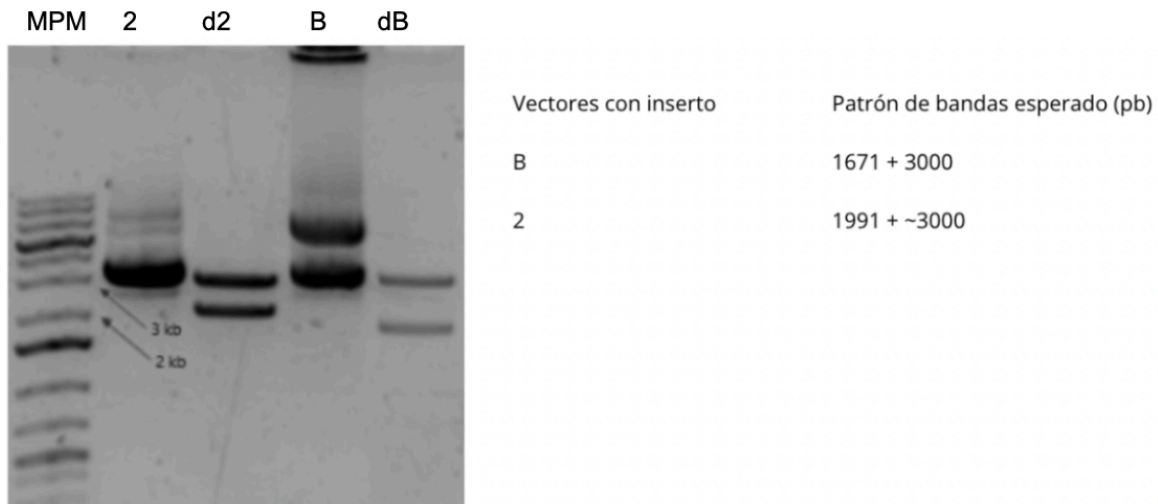


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Se muestran los resultados de la digestión (d2 y dB) de los plásmidos 2 y B con las enzimas de restricción NotI y XbaI. A la derecha en la tabla se muestran los tamaños de banda esperados para la digestión con NotI y XbaI.

Finalmente, los plásmidos 2 y B se enviaron a secuenciar para verificar que las construcciones no tuvieran mutaciones.

4.8 Subclonado de Fmini y Fmil en el vector pZero_blunt/pabaA

Una vez verificado que las construcciones no presentaban mutaciones en su secuencia, las mismas fueron subclonadas en el plásmido Zero_blunt/pabaA, dando lugar los plásmidos Pmil/pabaA y Pmini/pabaA. Este plásmido, porta el marcador de selección pabaA, que complementará la auxotrofia por el ácido p-aminobenzoico de la cepa receptora de *A. nidulans* (MVD 17), permitiendo la selección de los transformantes. Con este fin, se repitió la digestión de los plásmidos 2 y B con las enzimas de restricción NotI y XbaI, para obtener una buena cantidad de ambos insertos y continuar con el subclonado. Las construcciones a subclonar en pZero_blunt/pabaA fueron purificadas por gel, y ligadas en el vector pZero_blunt/pabaA digerido con las mismas enzimas. Los productos de ligación fueron transformados en células competentes de *E.coli* DH5α. Se seleccionaron 10 colonias resistentes a kanamicina (el plásmido Zero_blunt/pabaA porta un gen de resistencia a este antibiótico) de cada construcción y se analizó mediante PCR en colonia si las mismas tenían las construcciones de interés (Figura 22). Los primers fueron seleccionados complementarios a regiones comprendidas en el inserto, que abarcan unos 820 pb de la secuencia codificante de msGFP2, presente en aquellas colonias que incorporaron el plásmido con las construcciones.

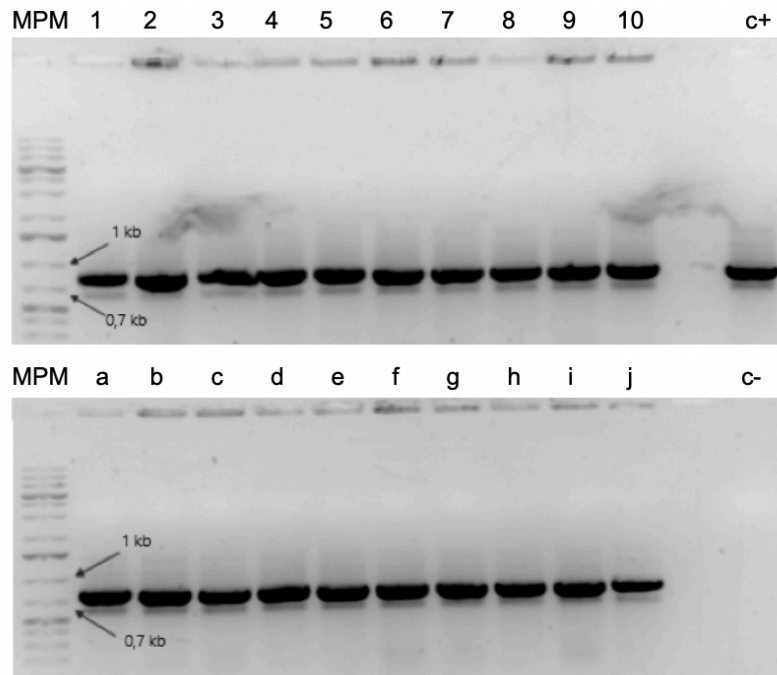
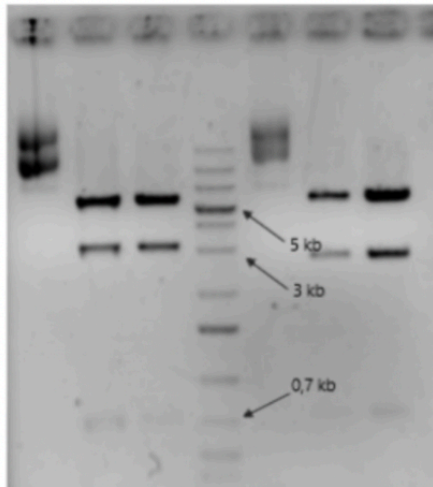


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de la reacción de PCR en colonia utilizando como molde las colonias transformadas con Pmil/*pabaA* y en la inferior con Pmini/*pabaA*. Como control positivo (c+) para la PCR se utilizó como molde el plásmido pQEGONA-msGFP2 (Valbuena et al., 2020) que porta la secuencia codificante para msGFP2, y como control negativo (c-) se realizó la PCR sin ADN.

Todas las colonias analizadas parecen presentar las construcciones, por lo tanto, se decidió continuar trabajando con dos de cada una. Las mismas se cultivaron y se realizó la extracción de ADN plasmídico. Previo a la transformación de *A. nidulans*, los plásmidos fueron analizados por restricción con la enzima XhoI para verificar la presencia de la construcción y del marcador *pabaA* (Figura 23).

1 d1 d2 MPM a da db



Vectores con inserto	Patrón de bandas esperado (pb)
B	727 + 2728 + 5727
2	727 + 3075 + 5727

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa 1% con los resultados de la digestión de los plásmidos pZero_blunt/*pabaA* ligados a las construcciones Fmil (1 y 2) y Fimi (a y b). d1, d2, da y db corresponden a las digestiones de los mismos con la enzima de restricción XhoI. A la derecha en la tabla se muestran los tamaños de banda esperados para la digestión con XhoI.

4.9 Transformación de *A. nidulans* con los plásmidos Pmil/*pabaA* y Pmini/*pabaA*

Los plásmidos Pmil/*pabaA* y Pmini/*pabaA* fueron transformados en la cepa MVD17, obteniéndose los transformantes Tmil y Tmini respectivamente. Dado que los plásmidos tienen el gen *pabaA* y la cepa MVD17 porta la mutación *pabaA1*, los transformantes adquieren la capacidad de crecer sin paba en el medio, y según esta característica se realizó su selección. Una vez seleccionados, los transformantes fueron purificados, y se verificaron sus auxotrofías así como también los de las cepas receptora y control (ver Materiales y Métodos). El crecimiento normal de los transformantes indica que la expresión de msGFP2 tanto bajo la expresión de la versión mini del promotor *PgpdA* como de la versión completa, no resulta deletérea para el organismo (Figura 24).

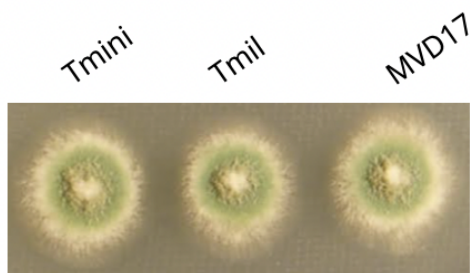
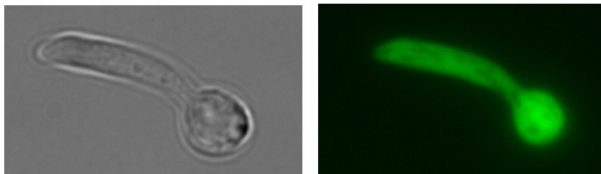


Figura 24. Ensayo de crecimiento en placa de las cepas transformantes Tmini y Tmil. Como control se utilizó la cepa receptora MVD17. El cultivo se realizó a 37 °C durante 48 horas en MM con amonio como fuente de nitrógeno y los suplementos correspondientes.

4.10 Determinación de la expresión de msGFP2 mediante microscopía de epifluorescencia

Con el fin de evaluar la expresión de msGFP2 de los transformantes Tmini y Tmil, los mismos fueron analizados mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 25) (ver 3.2.3).

Tmini



Tmil

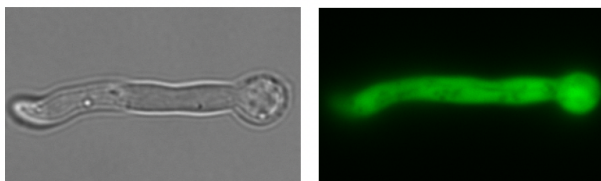


Figura 25. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de los transformantes Tmini y Tmil. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 100X. Como control de autofluorescencia se utilizó la cepa MVD001 (datos no mostrados). A la izquierda de cada imagen de fluorescencia se muestra la imagen de campo claro respectiva.

Las imágenes de microscopía de epifluorescencia de los transformantes Tmini y Tmil (Figura 25) muestran que ambos transformantes expresan msGFP2 en el citoplasma. Tanto bajo el control de la versión completa del promotor, que permite una alta expresión constitutiva, como de la versión mini, que permite una expresión constitutiva menor, se detecta una señal fuerte de msGFP2. El nivel de expresión de msGFP2 obtenida a través del promotor *PgpdA_mini* parece ser suficiente para experimentos futuros que permitan profundizar en la determinación de posibles SS como la planteada en este trabajo en el caso UreA. Con este nivel de expresión, es posible realizar el seguimiento de la proteína reportera, sin necesidad de recurrir a expresión muy alta. La clara localización citoplasmática de la proteína reportera, permitirá, a futuro verificar la capacidad de posibles SS al ser fusionadas a su extremo N-terminal, de localizar la señal en el RE.

5. Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo, utilizando la estrategia de mutagénesis dirigida por Fusion-PCR se logró generar la construcción *ureA Δ 2-7::gfp::pyrGAF*, que al ser transformada en *A. nidulans* dio lugar a la cepa mutante *ureA Δ 2-7*. A través de ensayos de Southern Blot realizados por la Lic. Ania Gómez, se determinó que la cepa *ureA Δ 2-7* se trata de un transformante monocopia. Mediante el análisis de la cepa generada, se determinó que la delección del trecho de AA 2-7 del N-terminal de UreA no tiene efectos en los niveles de síntesis del transportador, así como tampoco afecta el transporte del sustrato, siendo el mutante *ureA Δ 2-7* capaz de crecer en medios con urea como única fuente de nitrógeno. En concordancia con esto, tampoco se observaron cambios en la localización subcelular del transportador en el mutante *ureA Δ 2-7*, que mantiene su localización característica en membrana plasmática, septos, vesículas y vacuolas.

Por otro lado, se lograron generar las construcciones *PgpdA_mini-msGFP2-ter_crgA_AF* (Fmini) y *PgpdA_1000-msGFP2-ter_crgA_AF* (Fmil) mediante Fusion-PCR, y clonaras en el plásmido pZero_blunt/*pabaA*. Asimismo, se logró determinar que la expresión de msGFP2 no resulta deletérea para *A. nidulans* tanto bajo el control del promotor *PgpdA_1000* como bajo el control de la versión *PgpdA_mini*, y observar la expresión de la proteína reportera msGFP2 a nivel del citoplasma en los transformantes de ambos plásmidos, determinando que la expresión de msGFP2 bajo control del promotor *PgpdA_mini* es suficiente para futuros experimentos. Esta herramienta será útil a la hora de profundizar en la determinación de la SS, ya que podrá fusionar posibles SS hacia el N-terminal de msGFP2, y de esta forma, sería posible determinar su capacidad de direccionamiento al RE. Mediante los ensayos realizados en este trabajo, no es posible descartar que los aminoácidos 2 a 7 del UreA sean capaces de dirigir péptidos nacientes hacia la membrana del RE, por lo que resultaría interesante realizar la fusión del N-terminal de UreA a msGFP2 para evaluar su capacidad de actuar como SS en futuros experimentos. La fusión del primer trecho hidrofóbico de UreA hacia el N-terminal de la proteína reportera, así como del primer TMD de UreA, permitiría la evaluación de la capacidad de actuar como señal de ambos péptidos de forma independiente. Esto permitiría responder las preguntas que quedan pendientes a partir de los resultados de este trabajo: el primer trecho hidrofóbico de UreA, ¿tiene un rol como SS? En caso de que lo tenga, ante su ausencia, ¿es SRP capaz de reconocer al primer TMD manteniendo así la correcta expresión y funcionalidad del transportador en el mutante *ureA Δ 2-7*? O por el contrario, ¿es el rol de SS realizado exclusivamente por el primer TMD de UreA?

6. Referencias

- Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S., & Ramon, A. (2010). UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12), 1023-1033. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.07.004>
- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X., & Shan, S. (2013). Signal Recognition Particle: An Essential Protein-Targeting Machine. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 693-721. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-164732>
- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Arst, H. N., & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, 126(2), 111-141. <https://doi.org/10.1007/BF00330988>
- Batey, R. T. (2000). Crystal Structure of the Ribonucleoprotein Core of the Signal Recognition Particle. *Science*, 287(5456), 1232-1239. <https://doi.org/10.1126/science.287.5456.1232>
- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A. E., & Rospert, S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1398-1403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808584106>
- Bernstein, H. D., Zopf, D., Freymann, D. M., & Walter, P. (1993). Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its *Escherichia coli* homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5229-5233. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5229>
- Busch, W., & Saier, M. H. (2002). The transporter classification (TC) system, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(5), 287-337. <https://doi.org/10.1080/10409230290771528>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>

- Chartier, M., Gaudreault, F., & Najmanovich, R. (2012). Large-scale analysis of conserved rare codon clusters suggests an involvement in co-translational molecular recognition events. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *28*(11), 1438-1445. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts149>
- Clemons Jr, W. M., Gowda, K., Black, S. D., Zwieb, C., & Ramakrishnan, V. (1999). Crystal Structure of the Conserved Subdomain of Human Protein SRP54M at 2.1Å Resolution: Evidence for the Mechanism of Signal Peptide Binding. *Journal of Molecular Biology*, *292*(3), 697-705. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3090>
- Cymer, F., von Heijne, G., & White, S. H. (2015). Mechanisms of Integral Membrane Protein Insertion and Folding. *Journal of Molecular Biology*, *427*(5), 999-1022. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.014>
- Darlington, A. J., Scazzocchio, C., & Pateman, J. A. (1965). Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. *Nature*, *206*(984), 599-600. <https://doi.org/10.1038/206599a0>
- Diallinas, G., & Martzoukou, O. (2019). Transporter membrane traffic and function: Lessons from a mould. *The FEBS Journal*, *286*(24), 4861-4875. <https://doi.org/10.1111/febs.15078>
- ElBerry, H. M., Majumdar, M. L., Cunningham, T. S., Sumrada, R. A., & Cooper, T. G. (1993). Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *175*(15), 4688-4698. <https://doi.org/10.1128/JB.175.15.4688-4698.1993>
- Emr, S. D., & Silhavy, T. J. (1983). Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(15), 4599-4603.
- Etchells, S. A., & Hartl, F. U. (2004). The dynamic tunnel. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(5), 391-392. <https://doi.org/10.1038/nsmb0504-391>
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Baştürkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., ... Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative

- analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-1115. <https://doi.org/10.1038/nature04341>
- Gemmer, M., & Förster, F. (2020). A clearer picture of the ER translocon complex. *Journal of Cell Science*, 133(3), jcs231340. <https://doi.org/10.1242/jcs.231340>
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M., & Mercier, R. (1981). Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Research*, 9(1), 213-213. <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.213-b>
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R., & Pavé, A. (1980). Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Research*, 8(1), 197-197. <https://doi.org/10.1093/nar/8.1.197-c>
- Hanson, G., & Coller, J. (2018). Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 20-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>
- Hegde, R. S., & Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(10), 563-571. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.08.004>
- Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2021). The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00413-2>
- Hussmann, J. A., Patchett, S., Johnson, A., Sawyer, S., & Press, W. H. (2015). Understanding Biases in Ribosome Profiling Experiments Reveals Signatures of Translation Dynamics in Yeast. *PLOS Genetics*, 11(12), e1005732. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005732>
- Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *Journal of Molecular Biology*, 151(3), 389-409. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90003-6)
- Jung, H. (2002). The sodium/substrate symporter family: Structural and functional features. *FEBS Letters*, 529(1), 73-77. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03184-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03184-8)
- Kaiser, C. A., Preuss, D., Grisafi, P., & Botstein, D. (1987). Many random sequences

- functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science (New York, N. Y.)*, 235(4786), 312-317. <https://doi.org/10.1126/science.3541205>
- Komar, A. A. (2009). A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.10.002>
- Liaci, A. M., & Förster, F. (2021). Take Me Home, Protein Roads: Structural Insights into Signal Peptide Interactions during ER Translocation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11871. <https://doi.org/10.3390/ijms222111871>
- Liu, G.-W., Sun, A.-L., Li, D.-Q., Athman, A., Gilliham, M., & Liu, L.-H. (2015). Molecular identification and functional analysis of a maize (*Zea mays*) DUR3 homolog that transports urea with high affinity. *Planta*, 241(4), 861-874. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2219-7>
- Liu, L.-H., Ludewig, U., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (2003). AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H⁺ Symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(3), 790-800. <https://doi.org/10.1105/tpc.007120>
- Liu, Y. (2020). A code within the genetic code: Codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00642-6>
- Morel, M., Jacob, C., Fitz, M., Wipf, D., Chalot, M., & Brun, A. (2008). Characterization and regulation of PiDur3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 912-921. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.01.002>
- Moriyama, E. N., & Powell, J. R. (1997). Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 45(5), 514-523. <https://doi.org/10.1007/pl00006256>
- Nagai, K. (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *The EMBO Journal*, 22(14), 3479-3485. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg337>
- Navarathna, D. H. M. L. P., Das, A., Morschhäuser, J., Nickerson, K. W., & Roberts, D. D. (2011). Dur3 is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase Dur1,2. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 1),

270-279. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045005-0>

Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there?

Nature Reviews Drug Discovery, 5(12), 993-996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>

Pateman, J. A., Dunn, E., & Mackay, E. M. (1982). Urea and thiourea transport in *Aspergillus*

nidulans. *Biochemical Genetics*, 20(7-8), 777-790. <https://doi.org/10.1007/>

BF00483973

Pechmann, S., Chartron, J. W., & Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by

nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nature*

Structural & Molecular Biology, 21(12), 1100-1105. <https://doi.org/10.1038/>

nsmb.2919

Pechmann, S., & Frydman, J. (2013). Evolutionary conservation of codon optimality reveals

hidden signatures of co-translational folding. *Nature structural & molecular biology*,

20(2), 237-243. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2466>

Percudani, R., Pavesi, A., & Ottonello, S. (1997). Transfer RNA gene redundancy and

translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*,

268(2), 322-330. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0942>

Saier, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane

solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(2),

354-411. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000>

Sanguinetti, M., Amillis, S., Pantano, S., Scazzocchio, C., & Ramón, A. (2014). Modelling

and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of

urea/H⁺ transporters in fungi and plants. *Open Biology*, 4(6), 140070. <https://doi.org/>

10.1098/rsob.140070

Sanguinetti, M., Iriarte, A., Amillis, S., Marín, M., Musto, H., & Ramón, A. (2019). A pair of

non-optimal codons are necessary for the correct biosynthesis of the *Aspergillus*

nidulans urea transporter, UreA. *Royal Society Open Science*, 6(11), 190773. [https://](https://doi.org/)

doi.org/10.1098/rsos.190773

Scazzocchio, C., & Darlington, A. J. (1968). The induction and repression of the enzymes of

purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 166(2),

557-568. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(68\)90243-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(68)90243-8)

- Shao, S., & Hegde, R. S. (2011a). Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 25-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154125>
- Shao, S., & Hegde, R. S. (2011b). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 25-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154125>
- Sørensen, M. A., & Pedersen, S. (1991). Absolute in vivo translation rates of individual codons in Escherichia coli. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *Journal of Molecular Biology*, 222(2), 265-280. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90211-n](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90211-n)
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., Oakley, B. R., & Oakley, B. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), 3111-3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2-3), 205-221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)
- Todd, R., Davis, M., & Hynes, M. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature protocols*, 2, 811-821. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
- Valbuena, F. M., Fitzgerald, I., Strack, R. L., Andruska, N., Smith, L., & Glick, B. S. (2020). A photostable monomeric superfolder green fluorescent protein. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 21(8), 534-544. <https://doi.org/10.1111/tra.12737>
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. *Journal of Molecular Biology*, 184(1), 99-105. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90046-4)
- Wang, W.-H., Köhler, B., Cao, F.-Q., Liu, G.-W., Gong, Y.-Y., Sheng, S., Song, Q.-C., Cheng, X.-Y., Garnett, T., Okamoto, M., Qin, R., Mueller-Roeber, B., Tester, M., & Liu, L.-H. (2012). Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. *New Phytologist*, 193(2), 432-444. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03929.x>

Weinberg, D. E., Shah, P., Eichhorn, S. W., Hussmann, J. A., Plotkin, J. B., & Bartel, D. P. (2016). Improved Ribosome-Footprint and mRNA Measurements Provide Insights into Dynamics and Regulation of Yeast Translation. *Cell Reports*, *14*(7), 1787-1799. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.043>

Zhao, L., Cui, Y., Fu, G., Xu, Z., Liao, X., & Zhang, D. (2021). Signal Recognition Particle Suppressor Screening Reveals the Regulation of Membrane Protein Targeting by the Translation Rate. *MBio*, *12*(1), e02373-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02373-20>

7. Anexo

7.1 Secuencia de la fusión *ureA* Δ 2-7::*gfp*::*pyrGAF*

Referencias:

5' y 3' UTR *ureA*

ureA

delección 2-7 (se indica en la secuencia que fue removida)

gfp

pyrGAF

```
AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGC
CTCGCTACCGGCGGGAATACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCCTA
TCGACTTAATCCCGTCATGGATGTCAAGGAAACGCTTGGATTGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATA
TATGCCTTGAATCTCATTGACACTAGTAACTCACGAAACCTGGAGCAGTCGAAGATAGTATCAC
ACCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCAGCTTGTCTGGGTCCATGTGGTTCGATGCACCGATGAC
AAGGGAGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTCGCTACCCGG
GTCCTGGTTTGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTC
TTCGCGTATGGCATATTCGGCGTATTCTATGGGCTCTTGAGTCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTC
TCTAACTGCCCGCAGAACTGGCGAAAACCTATTGCAAGAACTTTTTGTCACCATTGTATGCTTACC
TGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCCTCCTACGGTCTACTTGGGATTAGGACG
ATATTCCTCCCTACTTCGTAGACTAACTCCCAGTGAAGCATTGGGGGGAGAGTTTCGATGTGT
GGATTATAACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTC
CAAAACGGCTTGAGGTTGATAAGTGTGAATATATCCCTGTGCCAGAGGAGCCGTAGTAACCCT
GATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCACGTAGTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGG
GAGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATCTGCAGTCAAGTTATCAGT
TCTCGAGAATGACCATGGCCCTTCTCTTCAATGCGTGCTTCGGCCATGGCCGGCCCGTCCCAG
TTCAACTGTCGGGCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCCTG
ATAAGCCTACAATTTTCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCC
CAGTAAGGTTAACTCGCTGCTCCAGGCCATTCTTTTTCAGAGACCCTGAGTACGAAGTGAAGGAAT
GATGGAGAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTCAATCCTTTATTACGAAACATGGTCGTCTTATCATG
CCTTCCACGAGCTGGGACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTATCATTGCATCGCCAATA
ATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCAGCGGGATCGGAGATTTA
AGTCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACCTTAAAGATCTGGAA
ACTGCAGACACCAGACTGCCTGAAATTGTACTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTG
CTAGTTCTCCACTGGTTCTTCGGTTATCCAAAATGTTGCGGTTATAGCTGCCCCCGATGAAGCCG
GGGTAGAGACCGTTACGTTCACTGCTCCCCTCACCCAAGGGTTTGGGTACGGGATCATCATCGG
GCTCGGGTTCGCCTTTGCCCTGGTCATGATCTTCATCACCTGGTCCCTAAAGAGGTAAGTTTTGT
CAGACATTGGTTTCGAGCAGGACTAACGGTCTAGGTATCAACATGAGATTATCACGTCTGAGATGT
TCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTGTCTGAGCAGTTGGA
CCTGGGCAGCTACTCTGCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGGCCGTT
CTTCTATGCATCGGGTTGGTCTTCAACCCGGTATGACACGAAGGATATACTGACAGTTTGCAGGC
GCCACCGTTCAGATCATCTTGTGTTGCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACGCGCGCCTAACGC
ACACACATTCTGGAAGCCATCCGTGCCGTTACGGTACCGTCGTACATCTCGTCTTCATCGTTTT
CTGCCTGATGACCAACATCCTCGTTACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAAC
TCTATGACTGGCGTCCAGTTGTTGCAGCCTGCTTCTCCTCCCAATCGGTGTGGTTCTGTACAC
CCTTTTCGGAGGCATTAAAGCAACATTCATCACCGACTATATGCACACTGTTGTCATTGTCGTGATC
ATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTACGCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCCGCAAAGTCTA
TGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCGGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTC
```

ACCATGCGCTCCAAAGATGGCGGTATCTTCTGGGTCATCAACCTCGTCGGTAACTTCGGCACTGT
CTTCCTGGACAACGGCTACTACAACAAGGCCATCGCCGCGCACCCAGTCCACGCTTTCCTGGA
TATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTCGCTATTCCCTGGCTCTGCGCGACAACGATGGGTCTCTC
TGCACTTGCGCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTCGTCCTT
CCCTTTGCATCTGTGCAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCCTTATGATCTTTATG
GCCGTGACCTCTGCCTTCTCGGCCAGCTCATCGCCGTGTCCTCGATCCTCACCTACGATATCTA
CCAAGCCTACATCAACCCTGCCGCAAAGGGCAAACGCCTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGC
GTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGTCTTCACTACGCTGGTATCGGTATGGG
CTATCTCTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTCAGCCGTGTTCCCGGGCGCCATGACCCTCG
TCTGGAAGGGGCAGAACTGGATCGCGGCAGCCGCTCTCCAGTTTTGGGCCTCGCAATGTCCCT
GGTTGCGTGGCTTGTACAACAAAGACAGAGTATGGCGTCTTACCCTCGAAACCACAGGAGCA
AACTACCCCATGCTAGCGGGCAAACGTCGCCGCCCTTCTCAGCCCTGTCGTCTTCTCGCCAGTCT
TGACATACCTCTTCGGCCCTCAGAATTACGACTACGAATCCATGCGCGCCATCCGCAAAGTCGAT
GACTCGGATGTGCCGCGGCGGCACGTCGACCTCGAGCTCATTCCCGGCGCTTCCAATACAA
ACTCGTCCCCTTACAGCAACAGCAAGAGGAAGAGGAATAAGAAAACCTCAACAAAGCCGCATTT
ATTTCCCGCTGTCTCACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTCTTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATG
GCAGCGGGTACGTCTTCAGCAAGAAGTTCTTACAGGCTGGGTTGTTGTGGGCATCATCTGGCT
CTTTGGGACTGCGTTCGGGGTGATTCTATTCCCGCTCTGGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAGG
GTTGGTAAGCTTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAGCAGTGTCTGGTAGGCC
AGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGTGTTACACCGAGCGAGAAGATTGTTGC
AAAAAGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACT
GGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCA
GTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAGTTTATTTGCACTA
CTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCACCTATGGTGTTCAAT
GCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCT
GAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAAGACGACGGGAACCTACAAGACAC
GTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAAT
CGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCC
ACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACC
CGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCC
AATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT
TTCGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTG
CTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAACCGGTCGCCTCAAACAATGCT
CTTACCCTCTTCGCGGGTCTGAAATACCCTCACCTGGCAACAGCAATTGGCGCTTCAT
GGCTGTTTTTCCGATCTCTCTACTTGTACGGCTATGTGTACTCGGGTAAGCCACAAGGCA
AGGGCAGATTGCTGGGAGGTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTGAG
TGTGTTTGGTGTGGCCAAAGACATGATCTTACTGAGAGTTATTCTGTGTCTGACGAAA
TATGTTGTATATATATATATGTACGTTAAAAGTTCCGTGGAGTTACCAGTGATTGACCAA
TGTTTTATCTTCTACAGTTCTGCCTGTCTACCCATTCTAGCTGTACCTGACTACAGAATA
GTTAATTGTGGTTGACCCACAGTCGGAGGCGGAGGAATACAGCACCGATGTGGCCT
GTCTCCATCCAGATTGGCACGCAATTTTACACGCGGAAAAGATCGAGATAGAGTACGA
CTTTAAATTTAGTCCCGGCGGCTTCTATTTTAGAATATTTGAGATTTGATTCTCAAGCAAT
TGATTTGGTTGGGTCACCCTCAATTGGATAATATACCTCATTGCTCGGCTACTTCAACTCA
TCAATCACCGTCATACCCCGCATATAACCCTCCATTCCCACGATGTGCTCCAAGTCGCAA
TTGACTTACGGTGCTCGAGCCAGCAAGCACCCCAATCCTCTGGCAAAGAGACTTTTTGA
GATTGCCGAAGCAAAGAAGACAAACGTTACCGTCTCTGCTGATGTGACGACAACCCGA
GAACTCCTGGACCTCGCTGACCGTACGGAAGCTGTTGGATCCAATACATATGCCGTCTA
GCAATGGACTAATCAACTTTTGATGATACAGGTCTCGGTCCCTACATCGCCGTCATCAAG

ACACACATCGACATCCTCACCGATTTTCAGCGTCGACACTATCAATGGCCTGAATGTGCTG
GCTCAAAGCACAACCTTTTTGATCTTCGAGGACCGCAAATTCATCGACATCGGCAATACC
GTCCAGAAGCAATACCACGGCGGTGCTCTGAGGATCTCCGAATGGGCCACATTATCAA
CTGCAGCGTTCTCCCTGGCGAGGGCATCGTCGAGGCTCTGGCCAGACCGCATCTGC
GCAAGACTTCCCCTATGGTCCTGAGAGAGGACTGTTGGTCCTGGCAGAGATGACCTCC
AAAGGATCGCTGGCTACGGGCGAGTATACCAAGGCATCGGTTGACTACGCTCGCAAATA
CAAGAACTTCGTTATGGGTTTCGTGTCGACGCGGGCCCTGACGGAAGTGCAGTCGGAT
GTGTCTTCAGCCTCGGAGGATGAAGATTTTCGTGGTCTTCACGACGGGTGTGAACCTCT
CTTCCAAAGGAGATAAGCTTGGACAGCAATACCAGACTCCTGCATCGGCTATTGGACGC
GGTGCCGACTTTATCATCGCCGGTCGAGGCATCTACGCTGCTCCCGACCCGGTTGAAG
CTGCACAGCGGTACCAGAAAGAAGGCTGGGAAGCTTATATGGCCAGAGTATGCGGCAA
GTCATGATTTCTCTTGGAGCAAAGTGTAGTGCCAGTACGAGTGTGTGGAGGAAGGC
TGCATACATTGTGCCTGTCATTAACGATGAGCTCGTCCGTATTGGCCCCTGTAATGCCA
TGTTTTCCGCCCCCAATCGTCAAGGTTTTCCCTTTGTTAGATTCTACCAGTCATCTAGC
AAGTGAGGTAAGCTTTGCCAGAAACGCCAAGGCTTTATCTATGTAGTCGATAAGCAAAGT
GGACTGATAGCTTAATATGGAAGGTCCCTCAGGGACAAGTCGACCTGTGCAGAAGAGAT
AACAGCTTGGCATCACGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACTCATATATCTTGCGTTGTTGTG
TGTTTCAGCTAGCTAGATTCATTIATGTTTTGCGTTTGATTCAATTATACCCCCTCGTTACA
CATGTACCAAGTTTTTATACCAGGGTGGCGACCAGCGTTCATGATAAGATAGCTTATATAG
AATATGGCTATTTTATTAAGCATTATAATTCATTCTTACGGACCCTAGCTGAAGCAGTTATG
TCGTCCAAGCCGTCATTAACCTTTATAGAGCGAAATATAGAATTACAACTGGAAAGACAAG
AGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGAACAGTAACTTAGGTATCGT
CATCAATCTGAGAGTAACTCCAGTCTTTTCGAGGACCTGACGAACACTGCCTCAGAGGC
ATTTGCCATGAGCGCATCACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCCC
GACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGCTGCTGCGGGGTTTGTGCTGCTGATAACCCCC
CAAAGTATGCCTGCGGCGGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGGCCGAG
TGTCTGGGTTAATATCGGGGCGATCACTATTCTTGTTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTA
CTGAGAAGCAGTGGATCAGATGAAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCG
CAAGTCCTGGGTAATCGGCATGTGTAGCATGTAACCTCCTTGTACTTGTGCATTGCTAAT
GGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCAGTTCCTTTTCTTCGGTACAATACTGCCTTTAG
CAAAGGCAGGATAGTGCCATACAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTATACATGC
GTTAGCCCCAGGCGTAGTTAGTTAACTCAGGACAACATACCATCGTGTACACACCCGTC
CATTCCAATGGTTGCCTGTACGGAGTTTGTAGTCCAGATCCATTGGTAACTGTTGAACAGC
AGCCACGCCGTGTCCTTGTCTCAGAAATCGGGACTA

7.2 Secuencia de la fusión *PgpdA1000-msGFP2-ter_crgA_AF*

Referencias:

[PgpdA_1000](#) La versión completa del promotor abarca toda la secuencia con fondo celeste. En negrita se indica el sitio de corte de NotI agregado para el clonado.

[PgpdA_mini](#) La versión mini del promotor abarca la secuencia subrayada.

[Secuencia codificante para msGFP2](#)

[Terminador *crgA_AF*](#). En negrita se indica el sitio de corte de XbaI agregado para el clonado.

GCGGCCGCTCGGAGAATATGGAGCTTCATCGAATCACCGGCAGTAAGCGAAGGAGAAT
GTGAAGCCAGGGGTGTATAGCCGTCGGCGAAATAGCATGCCATTAACCTAGGTACAGAA
GTCCAATTGCTTCCGATCTGGTAAAAGATTCACGAGATAGTACCTTCTCCGAAGTAGGTA
GAGCGAGTACCCGGCGCGTAAGCTCCCTAATTGGCCCATCCGGCATCTGTAGGGCGTC
CAAATATCGTGCCTCTCCTGCTTTGCCCGGTGTATGAAACCGGAAAGGCCGCTCAGGAG
CTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTG
CACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGC
CCGGTGTGTGGCGGGGTTGACAAGTCTGTTGCGTCAGTCCAACATTTGTTGCCATATT
TTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATT
CATCTTCCCATCCAAGAACCCTTTATTTCCCCTAAGTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCA
TCCTTCCCATCCCTTATTCTTTGAACCTTTCAGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGC
TTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCACATGGATAGCACTGAGAGCCTGTTCC
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTC
AGCGTGCGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCAACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT
ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCACCTTCAAGGACGACGG
CACCTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCAT
CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA
GTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACGTGGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC
ACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCTGCCCGACAACCACTA
CCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTGGAGGCAGTGGCGGTTCTTAAACA
GCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCTGCCATGCATTAACCTTCATCCTACT
GTCCTACCCGCAGTACCCATTACATTTGCGGCAGATACCAGGTTGTTTTCTATTCCCTC
GGTTCTTCAGTTCCTCAGATATTACACTCGAGAAATTGGCGGCGATGCAGGAGTTTG
GTTGGTTTTAATTGTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTATGACATGCAATGTTTCGACGG
AAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCATTCTAGA

7.3 Secuencia de la fusión *PgpdAmini-msGFP2-ter_crgA_AF*

Referencias:

[PgpdA mini](#) La versión mini del promotor abarca la secuencia subrayada. En negrita se indica el sitio de corte de NotI agregado para el clonado, y 3 bases hacia el 5' agregadas para aumentar la eficiencia de corte de la enzima.

Secuencia codificante para msGFP2

Terminador *crgA_AF*. En negrita se indica el sitio de corte de XbaI agregado para el clonado.

GCGGCCGCCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCCTTTATTTCCCCTAAGT
AAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCTTTGAACCTTTCAGTT
CGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCAC
ATGGATAGCACTGAGAGCCTGTTCCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACG

GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCA
ACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC
CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCA
CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCACCTTCAAGGACGACGGCACCTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGG
GCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA
ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCC
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACGTGGAGGACG
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCG
TGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAA
CGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTGG
AGGCAGTGGCGGTTCTTAAACAGCAGAAGAATCTCTCTCCGCTGTTGCTTCAGTGTCTG
CCATGCATTAACCTTCATCCTACTGTCCTACCCGCAGTACCCATTACATTTGCGGCAGATA
CCAGGTTGTTTTCTATTCCCTCGGTTCTTCAGTTCTTCAGATATTACACTCGAGAAATT
GGCGGCGATGCAGGAGTTTGGTTGGTTTTAATTGTTTCAGTCTCCTTGACCTGATTTGTA
TGACATGCAATGTTTCGACGGAAGACTATCTCGGTGAATATACGTCATGAATCATTCTAGA