

# Informe final publicable de proyecto

## Desentrañando la endocitosis de UreA, el transportador de urea de *Aspergillus nidulans*

**Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2022\_1\_172485**

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2025

**SANGUINETTI MIRALLES, Manuel** (Responsable Técnico - Científico)

**MARTÍNEZ PIÑEYRO, Julieta** (Investigador)

**RAMÓN PACHECO, Ana** (Investigador)

**SCALESE, Santiago** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO  
\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

## Resumen del proyecto

Un aspecto importante del mantenimiento de la homeostasis celular y las respuestas al estrés es la regulación de la composición de los transportadores en la membrana plasmática responsables de la absorción y exportación de nutrientes, así como de otras moléculas pequeñas no permeables. Los mecanismos generales que controlan este proceso están altamente conservados entre los organismos eucariotas e involucran tanto la regulación transcripcional como la regulación del tráfico intracelular a través de la modulación del equilibrio de secreción, reciclaje y degradación de transportadores en respuesta a cambios en el entorno extracelular. Con respecto a este último, todos los transportadores de hongos, y varios transportadores de mamíferos, que se han estudiado, son regulados negativamente en respuesta a señales fisiológicas o de estrés, o en respuesta a la actividad de transporte en presencia de un suministro continuo de sustrato. Esta remoción selectiva de transportadores, mediada por endocitosis, es uno de los más importantes mecanismos de regulación, ya que permite una rápida adaptación de las células a cambios en el ambiente. En la regulación de este proceso endocítico participan tanto elementos en cis como factores en trans.

En este proyecto aportamos al conocimiento de estos mecanismos de regulación, utilizando como modelo UreA, el transportador de urea del hongo filamento *Aspergillus nidulans*. Nuestro grupo identificó elementos en cis presentes en el dominio C-terminal del transportador, así como elementos en trans (e.g. ubiquitin-ligasa y un adaptador para ésta) que estarían involucrados en el proceso de degradación de UreA mediado por endocitosis. En el marco de este proyecto logramos confirmar el rol de estos elementos en el proceso degradativo de UreA y generamos un sistema que permitirá identificar nuevos elementos en cis presentes en UreA, el cual puede ser adaptado para el estudio de estos elementos en otros transportadores de *A. nidulans*.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología Molecular**

**Palabras clave:** *Aspergillus nidulans* / UreA / endocitosis /

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Un componente importante del mantenimiento de la homeostasis celular y las respuestas al estrés es la regulación de la composición de los transportadores de membrana plasmática (MP), responsables de la absorción y exportación de nutrientes y otras moléculas pequeñas no permeables. Los mecanismos generales que controlan este proceso están altamente conservados entre los organismos eucariotas e implican tanto la regulación transcripcional como la modulación del equilibrio de secreción, reciclaje y degradación de transportadores en respuesta a los cambios en el entorno extracelular [1–3]. Con respecto a este último, todos los transportadores de hongos, y varios transportadores de mamíferos, que se han estudiado, son regulados negativamente en respuesta a señales fisiológicas o de estrés, o en respuesta a la actividad de transporte en presencia de un suministro continuo de sustratos [4,5]. Esta remoción selectiva de transportadores, mediada por un proceso de endocitosis es uno de los más importantes mecanismos de regulación, ya que permite una rápida adaptación de las células a cambios en el ambiente. Las vesículas endocíticas internalizadas se convierten en endosomas tempranos, que maduran a endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares y eventualmente se fusionan con la vacuola/lisosoma, en donde son degradados. Algo común en la endocitosis de transportadores, y posterior degradación vacuolar es la ubiquitinación (unión covalente de ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos) de residuos específicos de Lys [6]. Los procesos endocíticos han sido estudiados en hongos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* o

*Aspergillus nidulans* [7–9]. Las Lys modificadas por ubiquitinación están presentes casi exclusivamente en los extremos citosólicos de los transportadores [3,10,11]. En *S. cerevisiae* y *A. nidulans* la ubiquitinación de transportadores se lleva a cabo por una ubiquitin-ligasa de la familia HECT del tipo Nedd4, altamente conservada en hongos [12], denominada Rsp5 o HulA, respectivamente [10,13–15]. Rsp5/HulA posee 3 dominios WW que reconocen motivos PY (PPxY o LPxY) presentes en sus proteínas blanco. Sin embargo, la mayoría de los transportadores carecen de estos motivos, por lo que su ubiquitinación depende de proteínas adaptadoras, denominadas alfa-arrestinas [16,17]. El modelo actualmente aceptado es que estas proteínas se unen a motivos (parches) acídicos que se localizan generalmente en los extremos citosólicos de los transportadores, próximos a las Lys a ser ubiquitinadas. Los múltiples dominios PPxY presentes en las alfa-arrestinas son reconocidos por los dominios WW de Rsp5/HulA, reclutando de esta manera a esta ubiquitin-ligasa hacia la proximidad de las Lys a ubiquitinizar en el transportador (revisado en [11]). En *A. nidulans*, en los transportadores de purinas UapA y FurE, se demostró que un motivo acídico corto (E/DXEE), ubicado en el extremo C-terminal citosólico y próximo a las lisinas ubiquitinadas, actuaría como sitio de unión de la arrestina ArtA, siendo este esencial para la ubiquitinación y/o endocitosis [18,19]. Estos sitios de unión a arrestina también se describieron en el extremo N-terminal citosólico de los transportadores de metionina (Mup1) y arginina (Can1) de *S. cerevisiae* [20–22]. Estos hallazgos sugieren un mecanismo común para el reconocimiento de transportadores por arrestinas en ascomicetes, basado en las interacciones entre arrestinas y los parches acídicos presentes en los extremos citosólicos [3,20].

En este proyecto nos propusimos contribuir al conocimiento de estos mecanismos que regulan la endocitosis de transportadores de MP eucariotas utilizando como modelo el transportador de urea, UreA de *A. nidulans* [23]. Estudios previos de nuestro grupo han encontrado evidencia de la participación de factores reguladores en trans (ubiquitin-ligasa HulA y alfa-arrestina ArtA) y en elementos en cis (Lys candidatas a ser ubiquitinadas, y un parche acídico como posible sitio de unión de ArtA) en el extremo C-terminal del transportador, que participan de la endocitosis del transportador en respuesta a la adición de amonio al medio de cultivo. El tema central a investigar en este proyecto es el rol de estos elementos en cis y factores en trans identificados en la endocitosis de UreA. Para ello buscamos responder a las siguientes preguntas:

1) ¿Cuál es el rol en la degradación/ubiquitinación de UreA de los elementos en cis y factores en trans identificados?

Para determinar el rol de los elementos en cis y factores en trans, identificados en la endocitosis de UreA, se analizó si mutantes de los mismos son capaces de ser ubiquitinados y degradados. Con respecto al posible sitio de unión a la arrestina, no podemos descartar la posibilidad de que la secuencia identificada pueda formar parte de un motivo tridimensional, interactuando con otras partes de la molécula de UreA. Para verificar esto, nos propusimos fusionar la región C-terminal de UreA a la región C-terminal de AzgA, un transportador de purinas, prácticamente insensible a la endocitosis inducida por amonio [24]. Esto permite determinar si el extremo C-terminal de UreA es capaz de provocar la endocitosis de AzgA en estas condiciones. Esta estrategia fue empleada con éxito por Karachaliou et al [19].

2) ¿Existe una interacción directa entre ArtA y UreA?

A pesar de la extensa disección del tráfico intracelular de UapA (revisado en [3,9]), donde la evidencia bioquímica y genética implica una interacción entre UapA (y otros transportadores) con la arrestina ArtA, esto no pudo demostrarse experimentalmente *in vivo* [19]. Por esta razón, buscamos determinar si existe una interacción directa entre UreA y ArtA. La necesidad de ArtA para la endocitosis de UreA y la existencia de un posible sitio de unión a arrestina nos llevó a investigar si existe una interacción directa UreA-ArtA. Para esto, propusimos emplear la estrategia utilizada por Llopis-Torregrosa et al [25] en levadura, quienes demostraron la interacción *in vivo* entre la arrestina Rod1 y los transportadores Hxt1/Hxt6, mediante ensayos de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) y ensayos de co-inmunoprecipitación.

### 3) ¿Existen otros elementos en cis que participen de la endocitosis de UreA?

Mediante la generación de una quimera Mup1-GFP-His3, Guiney et al [20] diseñaron un método para la detección de mutantes del transportador Mup1 de levadura, incapaces de ser endocitados. Los autores fusionaron tanto GFP como la enzima biosintética de histidina, His3, a Mup1. Mup1 es internalizada por endocitosis en respuesta a la estimulación con metionina (internalización inducida por el sustrato [26]), por lo que las células de levadura que carecen de la enzima de biosíntesis de histidina His3 obtuvieron prototrofia de histidina mediante la expresión de Mup1-GFP-His3 en un medio que carece de metionina. En presencia de metionina, Mup1-GFP-His3 es endocitada, lo que provoca que las células vuelvan a ser auxótrofas de histidina. Las mutaciones, generadas por mutagénesis al azar (mediante error-prone PCR), que bloquearon la endocitosis, impidieron la degradación de la proteína quimérica y permitieron el crecimiento en ausencia de histidina incluso en presencia de metionina en el medio de cultivo. Nos propusimos generar una quimera similar con UreA para el mismo fin, para realizar posteriormente una mutagénesis al azar (química) sobre el transportador para obtener versiones mutantes del mismo que sean incapaces de ser endocitadas (en el caso de UreA en respuesta a la adición de amonio al medio de cultivo). Esto tenía como objetivo no solo identificar otros elementos en cis (o validar los elementos ya detectados) necesarios para la endocitosis del transportador, sino que también poner a punto un sistema para la detección de elementos en cis de otros transportadores de *A. nidulans*, en donde se ha reportado su endocitosis (e.g. PrnB, UapC y AgtA [27–29]).

#### Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los elementos que actúan en cis y en trans regulando la endocitosis de transportadores de membrana plasmática eucariota, utilizando como modelo el transportador de urea, UreA, del hongo filamento *Aspergillus nidulans*.

#### Objetivos específicos

- 1) Determinar si los elementos en cis y factores en trans previamente identificados en el dominio C-terminal de UreA participan en la ubiquitinación/degradación del transportador.
- 2) Determinar si el posible sitio de unión a ArtA identificado en el extremo C-terminal de UreA es suficiente para llevar a la internalización de AzgA.
- 3) Determinar si existe una interacción directa entre UreA y ArtA.
- 4) Identificación de otros elementos en cis que participen de la endocitosis de UreA.

#### Metodología/Diseño del estudio

##### 1) Cultivo y manipulación de *A. nidulans*

Se utilizaron medios y técnicas de cultivo estándar para este organismo[30]. Para inducir la expresión de ureA, los cultivos líquidos se realizaron con prolina como fuente de nitrógeno no represiva. La utilización de amonio como fuente de nitrógeno inhibe la expresión de ureA, y cuando se agrega al medio de cultivo, induce endocitosis del transportador [23]. La transformación de *A. nidulans* se llevó a cabo según [31].

##### 2) Construcción de “cassettes” génicos para la generación de las diferentes proteínas marcadas/de fusión y químéricas.

La construcción de los distintos “cassettes” génicos se realizó mediante la técnica Fusion-PCR[31,32], utilizada de rutina en nuestro laboratorio [23,33,34]. Todas las construcciones génicas se verificaron mediante secuenciación y la integración exclusiva de los “cassettes” se verificó mediante Southern blot.

### 3) Determinación de la ubiquitinación de UreA-GFP y sus versiones mutantes al imponer condiciones endocíticas.

Se aislaron fracciones enriquecidas en proteínas de membrana (según[24,35]) de las diferentes cepas que portan mutaciones en el dominio C-terminal de UreA, así como de la cepa UreA-GFP salvaje (esta última como control). Para UreA-GFP en el contexto genético *delta\_artA* y *hulA\_delta\_C2*, se utilizó una cepa de tipo salvaje para *artA* y *hulA* como control. Se inmunoprecipitó UreA-GFP mediante el uso de anticuerpos específicos anti-GFP (ratón) y Dynabeads conjugadas a IgG anti-ratón. Inicialmente se buscó verificar la identidad y la ubiquitinación de las proteínas inmunoprecipitadas por espectrometría de masa, pero luego se optó por detección de la ubiquitinación mediante Western blot con anticuerpo anti-ubiquitina (ver Resultados).

### 4) Evaluación del nivel de degradación de UreA-GFP en el contexto genético *delta\_artA* y *hulA\_delta\_C2*.

Las diferencias en el nivel de degradación de UreA-GFP en respuesta a la adición de amonio, se detectaron mediante Western blot con anticuerpos anti-GFP. En esta técnica es normal observar una banda correspondiente a la fusión UreA-GFP y otra correspondiente a la GFP libre. La detección de GFP libre es una medida indirecta estándar de la degradación vacuolar de proteínas de membrana fusionadas a GFP [36,37]. Por lo tanto, una mayor presencia de GFP libre en el extracto proteico indicaría una mayor degradación de UreA-GFP y viceversa.

### 5) Generación de una cepa para el aislamiento de mutantes con una endocitosis defectuosa de UreA

Se utilizó una estrategia similar a la empleada por Guiney et al [20], generando una cepa que expresa una proteína químérica UreA-GFP-PyrG (PyrG: enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas) en un contexto genético *pyrG89* (mutación de pérdida de función que genera auxotrofia por uridina y uracilo).

A diferencia de *Mup1*, UreA no está sujeto a la internalización inducida por el sustrato (sino que la misma es inducida por amonio), por lo que se empleó una estrategia diferente. Se generó una cepa que expresa constitutivamente la molécula químérica, colocando el gen *ureA-gfp-pyrG* bajo control del promotor constitutivo *gpdA* [38] (es decir, un promotor que no está sujeto a la represión por amonio). Se propuso generar una cepa capaz de: a) complementar la mutación *pyrG89* en un medio con fuentes de nitrógeno no preferenciales (e.g. prolina), pero no complementar esta mutación en un medio que contiene amonio; y b) localizarse en la MP en presencia de fuentes de nitrógeno no preferenciales (e.g. prolina), pero ser constitutivamente internalizada en presencia de amonio. En nuestro caso, al igual que Guiney et al [20], fue necesario sobreexpresar la alfa-arrestina (*ArtA*). A modo de control se aplicó la misma estrategia para generar una cepa que exprese una químera de UreA incapaz de ser internalizada (e.g. UreADEESEE/A6-GFP-PyrG).

Una vez obtenidas las cepas se procederá a la mutagénesis al azar (actualmente nos encontramos en esta etapa, ver Resultados), que a diferencia de lo realizado por Guiney et al [20], se realizará mediante una mutagénesis química mediante el uso de 4-nitroquinolina-1-óxido (estrategia utilizada previamente por nuestro grupo [33]). Se aislarán mutantes capaces de crecer en medio con amonio como fuente de nitrógeno en ausencia de uridina y uracilo (indicativo de un endocitosis defectuosa del transportador). Para verificar que las mutaciones que evitan la endocitosis de UreA se localicen en la secuencia codificante de *ureA*, y no en otro locus, se cruzarán [39] los mutantes aislados con una la cepa que exprese la químera UreADEESEE/A6-GFP-PyrG, que no puede ser endocitada (actualmente en proceso de generación). Se analizará la progenie de la cruce y si toda la progenie es capaz de crecer sin uridina y uracilo en medio con amonio como fuente de nitrógeno, se secuenciará el gen *ureA* del mutante en cuestión para identificar la mutación que provoca el defecto en la endocitosis.

## 6) Análisis de la interacción UreA-ArtA mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) y co-inmunoprecipitación

Se realizó un ensayo de BiFC, el cual permite la detección *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia de la interacción entre dos proteínas, mediante la reconstitución de YFP [40]. Para esto, se generó una cepa que co-expresa la fusión de UreA con la mitad N-terminal de YFP y la fusión de ArtA con la mitad C-terminal de YFP. Si la interacción tiene lugar, se esperaba detectar la reconstitución de YFP. Como control negativo, se generaron cepas que portan las fusiones por separado (e.g. una cepa que co-expresa UreA fusionado a YFP-N e YFP-C sin fusionar, y otra que coexpresa ArtA fusionada a YFP-C e YFP-N sin fusionar).

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, se generó una cepa que porta, además de UreA-GFP, una versión de ArtA marcada con una "tag" 3xHA (tres repeticiones consecutivas de un péptido de nueve aminoácidos de la glucoproteína de la superficie del virus de la gripe humana, generando la fusión ArtA-3xHA). Actualmente estamos realizando la puesta a punto del ensayo (ver Resultados), UreA-GFP se inmunoprecipitará con anticuerpo anti-GFP y ArtA-HAx3 con anticuerpo anti-HA (i.e. usando UreA-GFP y ArtA-HAx3 como "carnada", por separado). En estos inmunoprecipitados, la presencia o ausencia de las diferentes proteínas marcadas se detectará mediante ensayos de Western blot. Previo a la extracción de proteínas para llevar a cabo la inmunoprecipitación, se realizará un entrecruzamiento de proteínas (e.g mediante el uso de agente entrecruzante ditiobis(succinimidilo propionato) o DSP) para estabilizar las interacciones débiles *in situ*. Como control, se utilizarán cepas que expresen UreA sin marcar (UreA/ArtA-HAx3), ArtA sin marcar (UreA-GFP/ArtA) y una cepa que exprese solamente la GFP libre (ésta última para descartar la posibilidad de que ArtA interaccione directamente con GFP).

## Resultados, análisis y discusión

A continuación, se detallan y se discuten los resultados obtenidos en base a los objetivos específicos planteados en el proyecto:

**Objetivo específico 1:** Determinar si los elementos en *cis* y factores en *trans* previamente identificados en el dominio C-terminal de UreA participan en la ubiquitinación/degradación del transportador.

Mediante ensayos de Western blot se pudo determinar que, en respuesta a condiciones endocíticas (i.e. adición de amonio al medio de cultivo), la versión salvaje de UreA-GFP es degradada. Se puede observar una gran disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la fusión UreA-GFP y un aumento de la intensidad de la banda correspondiente a la GFP libre. Esto no ocurre en los diferentes mutantes analizados (tanto en los mutantes de los elementos en *cis* como en los mutantes de los elementos en *trans*), donde a pesar de estar presente el estímulo endocítico se puede observar una intensidad de banda correspondiente a UreA-GFP similar a la observada en ausencia de este estímulo. Esto indica que tanto las Lys 689 y 693, el parche acídico próximo a estas, la proteína adaptadora ArtA y la ubiquitin-ligasa HulA, son elementos necesarios para que tenga lugar la degradación del transportador en respuesta a la adición de amonio.

Para que tenga lugar la degradación de transportadores de membrana, éstos deben ser ubiquitinados [7–9], motivo por el cual se procedió a determinar si tanto la versión salvaje de UreA como los mutantes mencionados anteriormente podían ser ubiquitinados en condiciones endocíticas. Inicialmente se intentó realizar una inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP, a partir de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana de las diferentes cepas. Se realizó la puesta a punto del método; sin embargo, dada la baja solubilidad de las proteínas de membrana, el límite de detección del espectrómetro de masas y la elevada cantidad de anticuerpo requerida para inmunoprecipitar y detectar niveles suficientes de UreA, esta metodología resultó económicamente inviable para el desarrollo del proyecto. Por este motivo se procedió a realizar una inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP seguido de un Western blot con anticuerpo anti-ubiquitina sobre el inmunoprecipitado. Esto permitió determinar que la versión salvaje de UreA es

ubiquitinada en condiciones endocíticas, y que las dos Lys identificadas son ubiquitinadas. No se detectó ubiquitinación ni en el doble mutante K689R/K693R ni en el mutante de HulA. Los simples mutantes K689R y K693R muestran ubiquitinación, aunque en menor medida que la proteína salvaje. Por otra parte, el mutante del posible sitio de unión de ArtA y el mutante que carece de ArtA, muestran una muy leve señal de ubiquitinación, sugiriendo la importancia de estos elementos en el proceso de ubiquitinación.

Estos resultados confirman el rol clave de los elementos en *cis* y *trans* analizados en la ubiquitinación de UreA, la cual tiene como consecuencia la degradación del transportador.

**Objetivo específico 2:** Determinar si el posible sitio de unión a ArtA identificado en el extremo C-terminal de UreA es suficiente para llevar a la internalización de AzgA.

La fusión del dominio C-terminal de UreA al transportador AzgA tuvo como resultado un aumento en la endocitosis y posterior degradación de este transportador en respuesta a la adición de amonio. Esto pudo determinarse tanto mediante Western blot, como mediante ensayos de microscopía de epifluorescencia dado que las distintas versiones de AzgA (salvaje y AzgA-C-terminal UreA) se encuentran fusionados a la GFP. Estos resultados demuestran que el dominio C-terminal de UreA es capaz de llevar a la internalización de AzgA (en respuesta a la adición de amonio), por lo que los elementos en *cis* presentes en este dominio son suficientes para mediar la ubiquitinación y posterior degradación.

**Objetivo específico 3:** Determinar si existe una interacción directa entre UreA y ArtA.

Se procedió a determinar la interacción entre UreA y ArtA mediante ensayos de BiFC y co-inmunoprecipitación. Se generaron todas las cepas necesarias para realizar estos ensayos (incluyendo los controles necesarios) y se procedió, en primera instancia, a realizar el ensayo de BiFC. No se observó fluorescencia, lo cual indicaría que, o bien no existe una interacción directa entre estas proteínas, o que esta interacción es demasiado débil y/o transitoria como para ser detectada por esta aproximación.

Dado que el ensayo de co-inmunoprecipitación incluye el uso de un agente de entrecruzamiento, que estabilizaría esta interacción débil/transitoria, esta podría (de existir) ser detectada. La obtención de las cepas necesarias para realizar este ensayo fue más dificultosa de lo esperado, lo que retrasó la realización del mismo durante el período informado del proyecto. Actualmente estamos realizando la puesta a punto del ensayo.

**Objetivo específico 4:** Identificación de otros elementos en *cis* que participen de la endocitosis de UreA.

La adaptación de la estrategia empleada por Guiney et al [20] en nuestro sistema fue exitosa. Se logró generar una cepa portadora de la quimera UreA-GFP-PyrG incapaz de crecer en presencia de amonio como fuente de nitrógeno y en ausencia de uridina y uracilo en el medio de cultivo, y capaz de crecer en presencia de fuentes secundarias de nitrógeno (i.e. nitrato de sodio) y en ausencia de uridina y uracilo. Para lograr esto, fue necesario sobreexpresar la proteína adaptadora ArtA, al igual que Guiney et al[20], lo que retrasó la obtención de la cepa deseada.

Dado que la idea es aislar mutantes (por mutagénesis química) capaces de crecer en medio con amonio como fuente de nitrógeno en ausencia de uridina y uracilo (indicativo de una endocitosis defectuosa del transportador), es importante determinar que las mutaciones que evitan la endocitosis de UreA se localicen en la secuencia codificante de ureA, y no en otro locus. Para esto, como se mencionó anteriormente, es necesario generar una cepa que exprese la quimera UreADEESEE/A6-GFP-PyrG (ver metodología). Actualmente estamos generando dicha cepa, y estamos en proceso de realizar la mutagénesis química sobre la cepa ya obtenida.

## Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron verificar el rol de los elementos en cis (673-DEESEE-678, K689 y K693) presentes en el dominio C-terminal de UreA y los elementos en trans (ArtA y HulA), previamente identificados por nuestro grupo, en la ubiquitinación y posterior degradación del transportador. Si bien no pudimos determinar la interacción directa entre UreA y ArtA mediante el ensayo de BiFC, queda confirmar este resultado mediante el ensayo de co-IP, el cual nos proponemos realizar próximamente.

Asimismo, logramos adaptar exitosamente la estrategia empleada por Guiney et al [20] en nuestro sistema. En breve procederemos con la mutagénesis química para aislar mutantes en UreA (UreA-GFP-PyrG) capaces de crecer en ausencia de uridina y uracilo y en presencia del estímulo endocítico (presencia de amonio en el medio de cultivo), y así poder identificar nuevos elementos en cis necesarios para la internalización del transportador.

Por todo lo anteriormente mencionado, creemos que los resultados obtenidos en este proyecto contribuyen al conocimiento de los elementos que actúan en cis y en trans regulando la endocitosis de transportadores de membrana plasmática eucariota. Esperamos poder publicar estos resultados en una revista internacional arbitrada en un futuro cercano.

## Referencias bibliográficas

1. Barlowe CK, Miller EA. 2013 Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193, 383–410. (doi:10.1534/genetics.112.142810)
2. MacGurn JA, Hsu P-C, Emr SD. 2012 Ubiquitin and Membrane Protein Turnover: From Cradle to Grave. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 231–259. (doi:10.1146/annurev-biochem-060210-093619)
3. Mikros E, Diallinas G. 2019 Tales of tails in transporters. *Open Biol.* 9. (doi:10.1098/rsob.190083)
4. Foot N, Henshall T, Kumar S. 2017 Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol. Rev.* 97, 253–281. (doi:10.1152/physrev.00012.2016)
5. Zhang W, Du G, Zhou J, Chen J. 2018 Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82. (doi:10.1128/mmbr.00040-17)
6. Yau R, Rape M. 2016 The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.* 18, 579–586. (doi:10.1038/ncb3358)
7. Feyder S, De Craene J0, Bär S, Bertazzi DL, Friant S. 2015 Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1509–1525. (doi:10.3390/ijms16011509)
8. Peñalva MÁ. 2010 Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 684–692. (doi:10.1016/j.mib.2010.09.005)
9. Diallinas G, Martzoukou O. 2019 Transporter membrane traffic and function: lessons from a mould. *FEBS J.* 286, 4861–4875. (doi:10.1111/febs.15078)
10. Lauwers E, Erpapazoglou Z, Haguenauer-Tsapis R, André B. 2010 The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* 20, 196–204. (doi:10.1016/j.tcb.2010.01.004)
11. Barata-Antunes C, Alves R, Talaia G, Casal M, Gerós H, Mans R, Paiva S. 2021 Endocytosis of nutrient transporters in fungi: The ART of connecting signaling and trafficking. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 1713–1737. (doi:10.1016/J.CSBJ.2021.03.013)
12. Marín I. 2018 Origin and evolution of fungal HECT ubiquitin ligases. *Sci. Rep.* 8. (doi:10.1038/S41598-018-24914-X)
13. Belgareh-Touzé N, Léon S, Erpapazoglou Z, Stawiecka-Mirota M, Urban-Grimal D, Haguenauer-Tsapis R. 2008 Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 791–796. (doi:10.1042/BST0360791)
14. Léon S, Haguenauer-Tsapis R. 2009 Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 1574–1583. (doi:10.1016/j.yexcr.2008.11.014)
15. Gournas C, Amillis S, Vlanti A, Diallinas G. 2010 Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* 75, 246–260. (doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06997.x)
16. Lin CH, MacGurn JA, Chu T, Stefan CJ, Emr SD. 2008 Arrestin-Related Ubiquitin-Ligase Adaptors Regulate Endocytosis and Protein Turnover at the Cell Surface. *Cell* 135, 714–725. (doi:10.1016/j.cell.2008.09.025)
17. Nikko E, Pelham HRB. 2009 Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10, 1856–1867. (doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00990.x)
18. Papadaki GF, Lambrinidis G, Zamanos A, Mikros E, Diallinas G. 2019 Cytosolic N- and C-Termini of the *Aspergillus nidulans* FurE Transporter Contain Distinct Elements that Regulate by Long- Range Effects Function and Specificity. *J. Mol. Biol.* , 1–18. (doi:10.1016/j.jmb.2019.07.013)
19. Karachaliou M, Amillis S, Evangelinos M, Kokotos AC, Yialelis V, Diallinas G. 2013 The arrestin-like protein ArtA is essential for ubiquitination and endocytosis of the UapA transporter in response to both broad-range and specific signals. *Mol. Microbiol.* 88, 301–317. (doi:10.1111/mmi.12184)
20. Guiney EL, Klecker T, Emr SD. 2016 Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-

- Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol. Biol. Cell* 27, 4043–4054. (doi:10.1091/mbc.E16-08-0570)
21. Gournas C, Saliba E, Krammer E, Barthelemy C, Prévost M, Lemmon S. 2017 Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an  $\beta$ -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis. *28*. (doi:10.1091/mbc.E17-02-0104)
22. Gournas C, Gkionis S, Carquin M, Twyffels L, Tyteca D, André B. 2018 Conformation-dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. *115*, 3145–3154. (doi:10.1073/pnas.1719462115)
23. Abreu C, Sanguinetti M, Amillis S, Ramon A. 2010 UreA, the major urea/H<sup>+</sup>symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 1023–1033. (doi:10.1016/j.fgb.2010.07.004)
24. Pantazopoulou A, Lemuh ND, Hatzinikolaou DG, Drevet C, Cecchetto G, Scazzocchio C, Diallinas G. 2007 Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 44, 627–640. (doi:10.1016/j.fgb.2006.10.003)
25. Llopis-Torregrosa V, Ferri-Blázquez A, Adam-Artigues A, Deffontaines E, Van Paul H Heusden G, Yenush L. 2016 Regulation of the Yeast Hxt6 Hexose Transporter by the Rod1  $\beta$ -Arrestin, the Snf1 Protein Kinase, and the Bmh2 14-3-3 Protein. *J. Biol. Chem.* 291, 14973–14985. (doi:10.1074/jbc.M116.733923)
26. Menant A, Barbey R, Thomas D. 2006 Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells. *EMBO J.* 25, 4436–4447. (doi:10.1038/sj.emboj.7601330)
27. Tavoularis S, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. 2001 Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 33, 115–125. (doi:10.1006/fgb.2001.1280)
28. Valdez-Taubas J, Harispe L, Scazzocchio C, Gorfinkel L, Rosa AL. 2004 Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 42–51. (doi:10.1016/j.fgb.2003.09.003)
29. Apostolaki A, Erpazoglou Z, Harispe L, Billini M, Kafasla P, Kizis D, Peñalva MA, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. 2009 AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot. Cell* 8, 339–352. (doi:10.1128/EC.00270-08)
30. Pontecorvo G, Roper JA, Chemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ. 1953 The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–238. (doi:10.1016/S0065-2660(08)60408-3)
31. Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR, Oakley B. 2007 Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1, 3111–3120. (doi:10.1038/nprot.2006.405)
32. Oakley CE, Edgerton-Morgan H, Oakley BR. 2012 Tools for manipulation of secondary metabolism pathways: Rapid promoter replacements and gene deletions in *Aspergillus nidulans*. *Methods Mol. Biol.* 944, 143–161. (doi:10.1007/978-1-62703-122-6\_10)
33. Sanguinetti M, Amillis S, Pantano S, Scazzocchio C, Ramón A. 2014 Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H<sup>+</sup> transporters in fungi and plants. *Open Biol.* 4. (doi:10.1098/rsob.140070)
34. 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. *R. Soc. Open Sci.* 6. (doi:10.1098/RSOS.190773)
35. Galan JM, Moreau V, Andre B, Volland C, Haguenauer-Tsapis R. 1996 Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946–10952. (doi:10.1074/jbc.271.18.10946)
36. Shintani T, Klionsky DJ. 2004 Cargo Proteins Facilitate the Formation of Transport Vesicles in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 29889–29894. (doi:10.1074/jbc.M404399200)
37. Pinar M, Pantazopoulou A, Peñalva MA. 2013 Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1

- dependence, Golgi independence and ER involvement. *Autophagy* (doi:10.4161/auto.24483)
38. Pantazopoulou A, Peñalva MA. 2009 Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol. Biol. Cell* 20, 4335–4347. (doi:10.1091/mbc.E09-03-0254)
39. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. 2007 Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat. Protoc.* 2, 811–821. (doi:10.1038/nprot.2007.112)
40. Hu C-D, Grinberg A V., Kerppola TK. 2005 Visualization of Protein Interactions in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 29, 21.3.1-21.3.21. (doi:10.1002/0471143030.cb2103s29)

#### **Licenciamiento**

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)