

Informe final publicable de proyecto Profundización en la identificación de determinantes estructurales y funcionales de UreA

Código de proyecto ANII: FCE_3_2018_1_148002

27/09/2021

SANGUINETTI MIRALLES, Manuel (Responsable Técnico - Científico)

IDIARTE MONTIEL, Juan (Investigador)

DOURRON FERNÁNDEZ, Juliette (Investigador)

ALAMÓN UMA, Catalina (Investigador)

PANTANO GUTIERREZ, Sergio Fabian (Investigador)

RAMÓN PACHECO, Ana (Investigador)

AMILLIS, Sotiris (Investigador)

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

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS, FACULTY OF BIOLOGY, DEPARTMENT OF BOTANY,
MICROBIOLOGY

\\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* el transporte de urea tiene lugar a través de UreA, un simportador urea/H⁺ con ortólogos en hongos y plantas, perteneciente a la familia de los simportadores de sodio (SSS). Nuestro grupo llevó a cabo un estudio de la relación estructura- función de UreA mediante una estrategia de mutagénesis y modelado tridimensional. El mismo permitió identificar una serie de aminoácidos implicados en la unión, reconocimiento y translocación de la urea por parte del transportador. En este proyecto se propuso ahondar en el conocimiento de los determinantes estructurales y funcionales de UreA, mediante la identificación de nuevos residuos o regiones de UreA implicadas en la unión al sustrato y la selectividad por el mismo. En este sentido pudimos determinar que los aminoácidos W82, W84, N279 y T282 cumplen un rol en la interacción y/o selectividad por el sustrato, proponiendo a su vez, que la región en donde éstos se encuentran comprendería el sitio de unión al sustrato de UreA. Asimismo se realizó un análisis de los "loops" extracelulares 3 e intracelular 7, determinando que éstos poseen un rol estructural y funcional en UreA. Ya que la oligomerización de transportadores es un fenómeno que aparece con frecuencia en la biología de los mismos, pero no se conoce cuán general es ésta ni cuál es su rol para cada clase de proteínas de transporte, nos propusimos aportar a esta temática determinando si UreA es capaz de formar oligómeros. Se obtuvieron resultados preliminares que indicarían que UreA oligomeriza. Actualmente estamos realizando experimentos adicionales para confirmar ésto. Creemos que los resultados obtenidos en este proyecto contribuyen al conocimiento de la relación estructura/función de transportadores de hongos y plantas, así como en la determinación de la especificidad de transportadores en general.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología Molecular de hongos

Palabras clave: transportador de urea UreA / relación estructura/función / *Aspergillus nidulans* /

Introducción

En *Aspergillus nidulans* el transporte de urea tiene lugar a través de UreA, un simportador urea/H⁺ con ortólogos en hongos y plantas, perteneciente a la familia de los simportadores de sodio (SSS) [1]. Nuestro grupo de investigación lleva varios años trabajando en la caracterización del transporte de urea en *A. nidulans*. El gen *ureA* fue clonado por complementación de función en una cepa mutante de pérdida de función (*ureA1*). El análisis de la secuencia del gen permitió determinar que UreA es una proteína de 693 aminoácidos, para la que se predicen 15 dominios transmembrana (TMS) y que pertenece a la familia SSS. UreA posee ortólogos en plantas y hongos y además, posee parálogos en otros *Aspergilli*, cuya función es desconocida. En colaboración con el grupo del Dr. Sergio Pantano en el Institut Pasteur de Montevideo, se abordó un estudio de la relación estructura/función de UreA mediante diferentes estrategias de mutagénesis y de predicción de la estructura tridimensional de UreA, en base a la modelización sobre transportadores cuya estructura tridimensional fue determinada [ver 2]. De este modo fue posible identificar una serie de residuos y regiones presuntamente relevantes para la interacción con el sustrato y el mecanismo de transporte. Se determinó que los residuos W82, Y106, A110, T133, D286, Y388, Y437 estarían implicados en la unión, reconocimiento y/o translocación de la urea. En particular, Y106 e Y437, se encuentran enfrentados constituyendo un filtro de selectividad para la urea. También se identificaron residuos importantes para la estructura básica del transportador y su plegamiento, o para su correcto tráfico a la membrana [2].

Un análisis más exhaustivo del modelo estructural de UreA realizado anteriormente [2], permitió identificar un par de residuos aminoacídicos conservados en todos los transportadores de urea de hongos y plantas caracterizados hasta el momento (y no conservados en transportadores de otros sustratos, de función establecida, pertenecientes a la familia SSS), que podrían formar parte del sitio de interacción o unión al sustrato. Estos aminoácidos, W82 y W84, están localizados en el TMS 2. Éste tiene la particularidad de ser discontinuo, es decir, está compuesto por 2 mitades de hélice transmembrana que se unen a través de una región "desenrollada". En esta última se localizan estos aminoácidos. Cabe mencionar que para diversos transportadores las regiones desenrolladas presentes en TMS discontinuos, tienen un rol indispensable en el transporte de sustrato [3-5]. W82 y W84 se encuentran enfrentados en esta región, generando una especie de "ranura" en donde podría interaccionar la molécula de urea. En este contexto, los anillos aromáticos de W82 y W84 podrían estabilizar la carga positiva parcial del nitrógeno de la amina a través de interacciones de apilamiento o "stacking" amina-PI [6], similar a lo propuesto para los residuos Y106 e Y437 [2]. W82, mutado previamente [2], demostró ser importante para la funcionalidad del transportador. La mutación W82A provocó la pérdida de función de UreA,

mientras que la mutación W82F presentó una pérdida parcial de la función de transporte, sin verse afectada la afinidad por la urea. Esto significaría que si bien la urea se puede unir eficientemente, el mecanismo de translocación a través de la membrana se vería afectado. Por otra parte, la afinidad por otras moléculas similares (i.e. tiourea, acetamida y guanidina) se ve aumentada, lo que implicaría un rol del W82 en la selectividad por el ligando [2]. La posición relativa de W82 y W84 según el modelo estructural, podría explicar lo observado. Siendo el triptófano el más voluminoso de los aminoácidos, el espacio entre los dos triptófanos enfrentados permitiría acomodar más eficientemente una molécula pequeña como la urea, que otras de mayor tamaño. En base a lo anteriormente expuesto, se propuso estudiar más en profundidad el rol los aminoácidos W82 y W84 en la interacción con los diferentes ligandos de UreA para determinar si estos residuos efectivamente forman parte del sitio de interacción con el sustrato del transportador. Según el modelo estructural de UreA la N279 (TMS 7), se encuentra próxima a los W mencionados y posee propiedades fisicoquímicas que la hacen capaz de interactuar con la urea. Al igual que el W82 y W84, la N279 se encuentra conservada en los transportadores de urea de función establecida y además se encuentra expuesta al solvente. Por lo tanto, el rol de este aminoácido en la funcionalidad del transportador también fue analizado. Se esperaba, mediante la realización de un análisis mutacional, determinar que los aminoácidos W82, W84 y N279 forman parte del posible sitio de unión de la urea. La afinidad y especificidad de un transportador por su sustrato estaría, según la visión tradicional, determinada por un número discreto de interacciones entre éste y su sitio de unión en el transportador. Sin embargo, diferentes estudios genéticos, bioquímicos y de modelado sobre transportadores de *A. nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* [7-12] demostraron la existencia de determinantes de especificidad fuera del sitio de unión del sustrato. En el caso del transportador del ácido úrico de *A. nidulans*, UapA [7, 8], se identificaron varios mutantes capaces de cambiar la especificidad de sustrato de UapA localizados en diferentes dominios ("loop" entre TMS1-TMS2, y TMS11, TMS12, TMS13 y TMS14), ninguno de los cuales forma parte de sitio de unión al sustrato (TMS1, TMS3, TMS8-TMS10). Estas mutaciones confieren a UapA la capacidad de transportar purinas, pirimidinas y análogos voluminosos de la xantina, sin afectar la afinidad por los sustratos naturales de UapA, el ácido úrico y la xantina. Esto significa que el sitio de unión no estaría afectado. Se propone que los mismos formarían parte de dominios con función de "compuertas" que funcionarían como filtros de selección, controlando el acceso o liberación del sustrato de su sitio de unión (revisado en [7, 8]). Con el fin de determinar la existencia de determinantes de especificidad fuera del sitio de unión del sustrato en UreA, se abordó el estudio de la relevancia a nivel funcional y/o estructural de algunos "loops" de UreA. Estos "loops" no fueron tenidos en cuenta en la instancia de modelado, ya que éste permite considerar solamente aquellas porciones de la proteína que presentan una determinada estructura secundaria y/o que mapean en regiones conservadas con el transportador tomado como molde [2]. Entre las porciones no modeladas, se observó que el "loop" extracelular 3 (40 aminoácidos de largo, conecta TMS 6 y 7) es considerablemente más largo que los restantes "loops" extracelulares (largo predicho entre 4 y 25 aminoácidos). Asimismo, el "loop" intracelular 7 (conecta TMS 13 y 14), tiene un largo predicho de 58 aminoácidos, mientras que los restantes "loops" intracelulares tienen un largo de entre 3 y 22 aminoácidos. Interesantemente, esta característica (i.e. mayor largo predicho de los "loops" extracelular 3 e intracelular 7, en comparación con los demás), también se observa en la mayoría de los transportadores de urea caracterizados en hongos y plantas, lo que podría indicar un rol estructural/funcional de éstos. Para poner de manifiesto un posible rol funcional de estos "loops" se planteó realizar un análisis mutacional realizando deleciones parciales de los mismos. Asimismo se analizaron por mutagénesis, aminoácidos conservados presentes en los "loops" para analizar su función. De esta manera, se esperaba determinar si estos "loops" cumplen un rol en la estructura/función de UreA.

La oligomerización de transportadores es un fenómeno que aparece con frecuencia en la biología de los mismos, pero no se conoce cuán general es éste ni cuál es su rol para cada clase de proteínas de transporte. En algunos casos la oligomerización ha sido identificada como un fenómeno necesario para el correcto funcionamiento de otros transportadores eucariotas [13-17]. Es por eso que, con la finalidad de aportar a esta temática, en este proyecto se propuso analizar si UreA es capaz de formar oligómeros, ya que esta oligomerización puede ser relevante para la actividad de transporte [18]. Para esto se planteó la realización de un ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC [19]) mediante la reconstitución de la proteína amarilla fluorescente (YFP), así como un ensayo de co-inmunoprecipitación en una cepa que co-exprese moléculas de UreA con distintos "tags". Esta misma estrategia fue empleada por Martzoukou y colaboradores [20] quienes demostraron la oligomerización de UapA in vivo en *A. nidulans*, la cual luego fue confirmada al cristalizar la proteína (la misma cristalizó como dímero [18]). De forma complementaria, en caso de determinar la oligomerización de UreA, se propuso evaluar a través de simulaciones moleculares (a través de una colaboración con el Dr. Sergio Pantano), la posibilidad de que exista esta oligomerización. Se esperaba entonces determinar si UreA es capaz de formar oligómeros in vivo e in silico.

Metodología/diseño del estudio

1) Análisis mutacional

i- Análisis por mutagénesis sitio dirigida

Para analizar el rol de W82 y W84 en la interacción con los diferentes ligandos de UreA (urea, tiourea y acetamida) se generaron los mutantes W82Y, W84A, W84F, W84Y y W82F/W84F por mutagénesis dirigida. Por otra parte se realizaron las mutaciones N279A y N279Q, para evaluar el rol de este residuo en la funcionalidad del transportador. En base a los resultados obtenidos (ver más adelante) se generaron, además, las mutaciones T282A y T282S, S235A, S265A y D530A.

ii- Deleciones parciales de los "loops" extracelular 3" e intracelular 7

Para estudiar el rol estructural/funcional de estos "loops" se realizaron deleciones parciales de los mismos, generando lo siguientes mutantes:

Deleciones parciales "loop" extracelular 3 (comprende 40 aminoácidos, 228 a 267):

- UreA_Delta_228-237: deleción de aminoácidos 228 a 237.

- UreA_Delta_238-267: deleción de aminoácidos 238 a 267.

- En base a los resultados obtenidos (ver más adelante) se generó, además, la mutación UreA_Delta_238-247 (deleción de aminoácidos 238 a 247).

Deleciones parciales "loop" intracelular 7 (comprende 58 aminoácidos, 526 a 583):

- UreA_Delta_526-545: deleción de aminoácidos 526 a 545.

- UreA_Delta_546-555: deleción de aminoácidos 546 a 555.

- UreA_Delta_556-583: deleción de aminoácidos 556 a 583.

- En base a los resultados obtenidos (ver más adelante) se generó, además, la mutación UreA_Delta_568-575 (deleción de aminoácidos 568 a 575).

-1a: Generación de mutantes

Tanto las mutaciones sitio dirigidas como las deleciones parciales se realizaron empleando la técnica de Fusion-PCR [21], la cual permite la construcción de "cassettes" génicos para llevar a cabo reemplazos por doble recombinación homóloga. La misma es utilizada continuamente en nuestro grupo para deletar genes (entre ellos ureA; [1]), fusionar genes a promotores regulables, a proteínas reporteras (e.g. proteína verde fluorescente, GFP) y para la introducir mutaciones por mutagénesis dirigidas [2]. La mutación deseada se introduce en la secuencia de los oligonucleótidos a utilizar para generar fragmentos que luego son ensamblados. El diseño del método permite que en el "cassette" generado, ureA se encuentre fusionado al gen que codifica para la GFP (resultando GFP hacia el extremo C-terminal, separado de UreA por una secuencia de 5 repetidos GlyAla como "linker"). Cabe destacar que la fusión de UreA a la GFP no altera en absoluto la funcionalidad de la proteína [1]. Los "cassettes" también portan el marcador pyrG de *Aspergillus fumigatus*, que complementa la auxotrofia por la uridina y el uracilo, permitiendo la selección de las cepas mutantes. Los "cassettes" generados se encuentran flanqueados por las regiones 5' y 3' UTR de ureA, lo que permite la doble recombinación homóloga en el locus ureA.

Por otra parte, se utilizaron como cepas receptoras para la transformación mutantes delta_nkuA lo que favorece la recuperación de cepas con integraciones en un locus particular [22]. La presencia de las mutaciones fue verificada por secuenciación y la integración exclusiva de los "cassettes" en el locus ureA se verificó mediante ensayos de Southern blot.

-1b: Análisis de funcionalidad de los mutantes obtenidos

Mediante ensayos de crecimiento en placa se evaluó la capacidad de los distintos mutantes generados de crecer sobre medio sólido con urea como única fuente de nitrógeno. Por otra parte, como la 2-tiourea (análogo tóxico de la urea) también es sustrato de UreA [23], se analizó el crecimiento de los mutantes obtenidos en presencia de este compuesto. Los ensayos de crecimiento se realizaron a 37 °C (temperatura óptima de crecimiento) y a 25 °C (para evaluar si las mutaciones generadas pueden dar lugar a fenotipos criosensibles, posibles indicativos de defectos en la estructura del transportador [24]).

-1c: Seguimiento de la localización subcelular de las versiones mutantes de UreA-GFP por microscopía de fluorescencia.

La localización subcelular de las versiones mutantes de UreA-GFP fue observada por microscopía de epifluorescencia. Es importante mencionar, que la localización subcelular permite clasificar a las mutaciones generadas en aquellas que afectan la topología/estructura o que afectan la cinética/funcionalidad del transportador. Los mutantes que porten estas últimas, además de presentar un defecto de crecimiento en placa en urea, se espera que se localicen en la membrana plasmática. En cambio aquellos mutantes cuya topología/estructura se vea afectada, son frecuentemente retenidos en el retículo endoplásmico (como parte del control de calidad operando en este compartimento [25]) y por lo tanto se observa señal fluorescente en este compartimento y no en la membrana plásmática.

-1d: Evaluación del nivel de síntesis proteica de las versiones mutantes de UreA-GFP por Western blot

Para la correcta interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos descritos anteriormente, fue necesario comprobar que no existan diferencias significativas en los niveles de proteína sintetizada entre el wt y los mutantes (es decir, que un determinado fenotipo observado sea resultado de la mutación en sí y no de un defecto en el proceso de síntesis de la proteína mutante). Ésto se realizó mediante la realización de Western blots utilizando anticuerpos anti-GFP. Es importante mencionar que en esta técnica es normal observar una banda correspondiente a la fusión UreA-GFP y otra correspondiente a la GFP libre, ya que la GFP es refractaria a la proteólisis [26] y por tanto puede ser detectada aún cuando la proteína fusionada a ésta sea degradada. Una mayor presencia de GFP libre en el extracto proteico indicaría una mayor degradación de UreA-GFP y viceversa. En algunos casos, mutantes que presentan defectos estructurales pueden superar el control de calidad del RE y llegar a la membrana plasmática. Sin embargo, este defecto estructural puede afectar su recambio proteico normal, lo que puede observarse al comparar las bandas correspondientes a la fusión UreA-GFP y de GFP libre.

-1e - Efecto de las mutaciones generadas en la actividad de transporte de UreA

La actividad de transporte se determinó mediante ensayos de cinética de transporte con urea radiactiva (^{14}C -urea), obteniéndose parámetros relativos a la afinidad por los distintos ligandos de UreA (urea, 2-tiourea y acetamida) y la velocidad de transporte. Comparando la velocidad inicial de transporte de ^{14}C -urea, de una cepa salvaje (UreA-GFP) con los mutantes de UreA generados, se determinaron diferencias en la actividad de transporte. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Sotiris Amillis (integrante del equipo de investigación) en la Universidad de Atenas.

-2: Ensayos para determinar si UreA oligomeriza

Para determinar si existe oligomerización de UreA, se utilizó la misma estrategia empleada por Martzoukou y colaboradores [20] quienes demostraron la oligomerización de UapA in vivo en *A. nidulans*, la cual luego fue confirmada al cristalizar la proteína (la misma cristalizó como dímero; [18]). La estrategia se describe a continuación.

-2a – Ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC)

Se utilizó un ensayo de BiFC mediante la reconstitución de la proteína amarilla fluorescente (YFP). Este ensayo permite la detección in vivo de la interacción de dos proteínas mediante la reconstitución de la YFP [19]. Para ello, se generó una cepa que co-expresa la fusión de UreA con la mitad N-terminal de YFP (UreA-YFP-N) y la fusión de UreA con la mitad C-terminal de YFP (UreA-YFP-C). La fusión de estas mitades de YFP se realizó en el extremo C-terminal de UreA. En el caso de que UreA forme oligómeros, se puede detectar la reconstitución de YFP mediante microscopía de fluorescencia. Como controles se generaron cepas que expresan cada fusión de UreA por separado (i.e. solamente UreA-YFP-N o solamente UreA-YFP-C).

-2b - Ensayos de co-inmunoprecipitación

De forma complementaria a los ensayos de BiFC, se generó una cepa que expresa, además de UreA-GFP, una versión de UreA marcada con un "tag" HA (un péptido de 9 aminoácidos – YPYDVPDYA - provenientes de la proteína Hemaglutinina) repetido 3 veces (3HA-UreA). Debido a los retrasos generados por la pandemia (tanto en lo que respecta a las limitaciones en el trabajo en el laboratorio, así como en los retrasos generados en la llegada de insumos que desde el exterior - como "kits!" de inmunoprecipitación), se llegó hasta la generación de esta cepa. Las etapas que se describen a continuación serán realizadas en los próximos meses:

Se aislarán fracciones enriquecidas en proteínas de membrana (según [27] y [28]) de la cepa generada y se realizará una inmunoprecipitación de UreA-GFP, mediante el uso de un anticuerpo específico anti-GFP (generado en ratón, Roche) y Dynabeads conjugadas a IgG anti-ratón (Invitrogen). Cabe destacar que ambas técnicas han sido puestas a punto en nuestro laboratorio. Las proteínas inmunoprecipitadas serán separadas por SDS-PAGE y las muestras serán transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales serán incubadas con anticuerpo anti-HA. De haber señal, correspondiente a la fusión 3HA-UreA, apoyaría la posibilidad de que se esté formando un oligómero (o al menos un dímero UreA-GFP/3HA-UreA). Luego se procederá de la misma manera pero esta vez inmunoprecipitando 3HA-UreA con anticuerpo anti-HA (i.e. utilizando esta vez a 3HA-UreA como "carnada") y se verificará la presencia de UreA-GFP (por Western blot con anticuerpo anti-GFP) en el inmunoprecipitado. Como control negativo se aplicará esta misma metodología en cepas que porten las fusiones por separado (i.e. una cepa que exprese solo la fusión UreA-GFP y otra que exprese solo la fusión 3HA-UreA).

Nota: las distintas fusiones mencionadas se realizaron a través de la construcción de "cassettes" génicos por la técnica

de Fusion-PCR (mencionada anteriormente).

- 3: Estudios teóricos sobre la forma de oligomerización de UreA

Una vez verificada la oligomerización de UreA por los ensayos de co-inmunoprecipitación, se utilizarán los modelos estructurales generados anteriormente [2], para realizar simulaciones moleculares de grano grueso [29] que permitirán un muestreo completo de las posibles superficies de oligomerización. Se introducirán diez copias de la proteína en una membrana modelo de fosfolípidos [30] y se realizarán simulaciones no sesgadas para recolectar estadística sobre las interacciones proteína-proteína, las cuales se verificarán durante la dinámica. Utilizando este tipo de procedimiento se ha logrado construir mapas de probabilidad que permiten determinar los aminoácidos con mayor probabilidad de pertenecer a la interfaz de oligomerización [31].

Resultados, análisis y discusión

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

1) Analizar por mutagénesis dirigida y ensayos funcionales, el rol de aminoácidos de UreA que se predice que forman parte del sitio de interacción con el sustrato, seleccionados en base al modelado tridimensional de UreA.

El análisis mutacional de los aminoácidos W82, W84 y N279 permitió confirmar la hipótesis de que éstos cumplen un rol en la interacción y/o selectividad por el sustrato, validando a su vez, que la región en donde éstos se encuentran comprendería el sitio de unión al sustrato de UreA. Los ensayos de crecimiento en placa (en urea y 2-tiourea) de los distintos mutantes generados mostraron fenotipos de pérdida de función en algunos casos, y en otros, fenotipos de crecimiento intermedios entre la cepa salvaje y una cepa que carece del transportador (cepa delta_ureA). Esto indicaría diferencias de afinidad por los distintos sustratos analizados. La localización subcelular de las versiones mutantes de UreA-GFP generadas, fue similar a la versión salvaje del transportador (i.e. membrana plásmica), indicando que las mutaciones generadas estaban afectando la cinética/funcionalidad del transportador, y no la topología/estructura del mismo (en este caso debería de observarse retención de las proteínas mutantes en el RE, lo cual no fue observado). Asimismo se observó, por Western blot, que las proteínas mutantes no presentaron diferencias significativas en los niveles de proteína sintetizada, en comparación con wt. Estos resultados confirman que la diferencia en la funcionalidad del transportador observado en placa, se debe a de las mutaciones en sí y no a una disminución de la síntesis proteica y/o a un defecto en la localización subcelular. Para determinar el efecto de las mutaciones generadas en la afinidad por los distintos ligandos de UreA (urea, 2-tiourea y acetamida) y la velocidad de transporte se realizaron ensayos de cinética de transporte con urea radioactiva. Los mismos confirmaron el rol de los aminoácidos en estudio, en la interacción/selectividad por el sustrato. En todos los casos se observaron cambios en la afinidad por los distintos ligandos y diferencias en la velocidad de transporte (15 – 70% con respecto a la cepa salvaje).

Los resultados obtenidos, llevaron a analizar más en profundidad, el posible sitio de unión al sustrato del transportador, a través del análisis de los modelos de UreA previamente generados [2] (esto fue realizado por el Dr. Sergio Pantano). Esto permitió identificar un nuevo aminoácido candidato a interactuar con los sustratos de UreA, la T282. En base a esto, se procedió de la misma manera que para el análisis de los aminoácidos previamente mencionados, y se verificó el rol de la T282 en la interacción/selectividad por el sustrato. Esto permitió validar, que la región en donde se encuentran los aminoácidos analizados comprendería el sitio de unión al sustrato de UreA.

2) Analizar el rol de los "loops" extracelular 3 e intracelular 7, a través de la generación de mutantes que porten deleciones parciales de los mismos, en la estructura/función de UreA.

En el caso de las deleciones parciales de los "loops" en cuestión, la mayoría de los mutantes presentaron un fenotipo en placa de pérdida de función (i.e. presentando un crecimiento residual en urea y resistencia a la 2-tiourea, al igual que la cepa delta_ureA). La localización subcelular de los mismos reveló que se encontraban principalmente retenidos en el RE, algo característico de proteínas que poseen afectada su topología/estructura. Esto reveló que el largo de los "loops" es clave para la correcta determinación estructural del transportador. Cabe destacar, que en el caso de la deleción parcial UreA_Delta_546-555, se observó un fenotipo similar a la cepa salvaje, tanto en placa cómo en localización subcelular. En base a los resultados obtenidos se generaron las deleciones parciales UreA_Delta_238-247 y UreA_Delta_568-575. En el caso de la primera, ésta presentó un fenotipo similar a las anteriores (i.e. pérdida de función y retención en el RE), y en el caso de la segunda, se observó un fenotipo similar a una versión salvaje de UreA. En lo que respecta a la síntesis proteica de estas versiones mutantes, se observó que aquellas que presentaron un fenotipo de pérdida de función, presentaron una menor cantidad de proteína sintetizada. Probablemente esto se deba a la inestabilidad estructural de las proteínas mutantes, las cuales provocan su degradación por mecanismos de control de calidad que operan en el RE. En el caso de las versiones que presentaron un fenotipo similar a UreA-GFP salvaje, se observó una mayor cantidad de proteína

sintetizada, probablemente, producto de una mayor estabilidad de la proteína mutada. Los ensayos de cinética de transporte revelaron que los mutantes que presentaron un fenotipo similar a la cepa salvaje, presentaron diferencias en la actividad de transporte. Se destaca el mutante UreA_Delta_546-555 el cual presentó una mayor velocidad de transporte que la cepa salvaje (130%) y una disminución de la afinidad por la 2-tiourea. En el caso del mutante UreA_Delta_568-575, este presentó una velocidad de transporte reducida con respecto a la cepa salvaje (85%), y una disminución considerable de la afinidad por la urea y 2-tiourea.

Ya que la mayoría de las deleciones parciales presentaron un fenotipo que dificultaba determinar el rol de los mismos en la funcionalidad del transportador (i.e. la mayoría de las deleciones provocaron retención en el RE y una disminución de la síntesis de UreA), se procedió a mutar aminoácidos que se encontraban conservados en los "loops" en cuestión. En particular los aminoácidos S235, S265 (localizados en el "loop" extracelular 3" y la D530 (localizada en el "loop" intracelular 7) se encontraban conservados en todos los transportadores de urea de hongos y plantas caracterizados hasta el momento (y no conservados en transportadores de otros sustratos, de función establecida, pertenecientes a la familia SSS).

Mediante mutagénesis sitio dirigida se generaron los mutantes S235A, S265A y D530A. El análisis de los mismos identificó un comportamiento similar a UreA-GFP salvaje en los análisis de crecimiento en placa, localización subcelular y niveles de síntesis proteica. No obstante, se observaron diferencias en la actividad de transporte con respecto a la cepa salvaje, observándose tanto una disminución de la velocidad de transporte (53-68%), como en la afinidad por la urea y 2-tiourea.

Estos resultados validan la hipótesis de que los "loops" extracelulares 3 e intracelular 7, poseen un rol estructural y funcional en UreA.

3) Determinar si UreA es capaz de formar oligómeros in vivo y, de forma complementaria, predecir mediante el uso de simulaciones moleculares esta oligomerización y las posibles superficies de interacción entre monómeros.

Se generaron las cepas necesarias para realizar los ensayos de BiFC (i.e. cepa que co-exprese UreA-YFP-N/UreA/YFP-C, cepa que exprese solo UreA-YFP-N y cepa que exprese solamente UreA-YFP-C, estos 2 últimas como control negativo). Inicialmente se intentó expresar las fusiones en cuestión utilizando el promotor endógeno de ureA, pero la señal de fluorescencia detectada en los ensayos de BiFC fue muy tenue, por lo que optó por la sobreexpresión de las fusiones involucradas mediante el uso del promotor del gen alcA de *A. nidulans* (inducible por etanol) [32]. A partir de esta modificación, fue posible detectar señal de BiFC, indicando que UreA sería capaz de oligomerizar. Para validar este resultado, se planteó el ensayo de co-inmunoprecipitación (mencionado anteriormente), para el cual se logró generar la cepa necesaria para su realización (cepa que co-exprese UreA-GFP y 3HA-UreA). Una vez confirmada la oligomerización a través de ensayos de co-inmunoprecipitación se buscará mediante simulaciones moleculares superficies de interacción entre monómeros de UreA.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron verificar el posible sitio de unión al sustrato en UreA, así como los aminoácidos que participan de esta unión/selectividad por el sustrato. Por otra parte se pudo determinar un rol estructural y funcional de los "loops" extracelulares 3 e intracelular 7. Finalmente, en lo que respecta a la oligomerización del transportador, más allá de que debemos validar los resultados obtenidos, hemos encontrado evidencia de que UreA oligomerizaría. Si esto se confirma, estaríamos incluyendo a UreA dentro de los transportadores que se ha determinado que oligomerizan, aportando entonces otra proteína modelo para el estudio del rol de la oligomerización en transportadores eucariotas. A futuro buscaremos identificar el rol de la misma en la actividad de transporte.

Por todo lo anteriormente mencionado, creemos que los resultados obtenidos en este proyecto contribuyen al conocimiento de la relación estructura/función de transportadores de hongos y plantas, así como en la determinación de la especificidad de transportadores en general.

Referencias bibliográficas

1. Abreu, C., et al., UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 2010. 47(12): p.1023-33.
2. Sanguinetti, M., et al., Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H⁺ transporters in fungi and plants. *Open Biol*, 2014. 4(6): p. 140070.
3. Vangelatos, I., et al., Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements APC amino acid transporters. *Mol Membr Biol*, 2009. 26(5): p. 356-70.
4. Shi, Y., Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys*, 2013. 42: p. 51-72.
5. Drew, D. and O. Boudker, Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem*, 2016. 85: p. 543-72.
6. Mitchell, J.B., et al., Amino/aromatic interactions in proteins: is the evidence stacked against hydrogen bonding? *JMol Biol*, 1994. 239(2): p. 315-31.
7. Diallinas, G., Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 207.
8. Diallinas, G., Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. *Trends Genet*, 2016. 32(9): p. 576-90.
9. Kryptou, E., et al., Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Mol Microbiol*, 2015. 96(5): p. 927-50.
10. Gournas, C., et al., The *Aspergillus nidulans* proline permease as a model for understanding the factors determining substrate binding and specificity of fungal amino acid transporters. *J Biol Chem*, 2015. 290(10): p. 6141-55.
11. Vangelatos, I., et al., Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. *Mol Membr Biol*, 2009. 26(5): p. 356-70.
12. Ghaddar, K., et al., Converting the yeast arginine can1 permease to a lysine permease. *J Biol Chem*, 2014. 289(10): p. 7232-46.
13. De Zutter, J.K., et al., Sequence determinants of GLUT1 oligomerization: analysis by homology-scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 2013. 288(28): p. 20734-44.
14. Zhen, J., et al., Dopamine transporter oligomerization: impact of combining protomers with differential cocaine analog binding affinities. *J Neurochem*, 2015. 133(2): p. 167-73.
15. Lasry, I., et al., In situ dimerization of multiple wild type and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem*, 2014. 289(11): p. 7275-92.
16. Tao, Y., et al., Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature*, 2015. 527(7577): p. 259-63.
17. Kilic, F. and G. Rudnick, Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3106-11.
18. Alguel, Y., et al., Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 11336.
19. Hu, C.D., A.V. Grinberg, and T.K. Kerppola, Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. Chapter 21: p. Unit 21 3.
20. Martzoukou, O., et al., Oligomerization of the UapA Purine Transporter Is Critical for ER-Exit, Plasma Membrane Localization and Turnover. *J Mol Biol*, 2015. 427(16): p. 2679-96.
21. Szewczyk, E., et al., Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc*, 2006. 1(6): p. 3111-20.
22. Nayak, T., et al., A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2006. 172(3): p. 1557-66.
23. Pateman, J.A., E. Dunn, and E.M. Mackay, Urea and thiourea transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet*, 1982. 20(7-8): p. 777-90.
24. Diallinas, G., *Aspergillus* transporters, in *Aspergilli, Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods.*, G.H.G.S.A. Osmani, Editor. 2007, CRC Press: Boca Ratón, FL, USA. p. 301-320.
25. Houck, S.A. and D.M. Cyr, Mechanisms for quality control of misfolded transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1818(4): p. 1108-14.
26. Chiang, C.F., et al., Green fluorescent protein rendered susceptible to proteolysis: positions for protease-sensitive insertions. *Arch Biochem Biophys*, 2001. 394(2): p. 229-35.
27. Galan, J.M. and R. Haguenaer-Tsapis, Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J*, 1997. 16(19): p. 5847-54.

28. Pantazopoulou, A., et al., Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 2007. 44(7): p. 627-40.
29. Darré L, Machado MR, Brandner AF, Ferreira S, Gonzalez HC, Pantano S. SIRAH: a structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation and long-range electrostatics. *JCTC*, 2015, 11:723.
30. Astrada S, Gomez Y, Obal G, Pritsch O, Vallespi MG, Bollati-Fogolin M. Comparative analysis reveals amino acids critical for anticancer activity of peptide CIGB-552. *J. Pep. Sci.* 2016, 22:711.
31. Periole X, Huber T, Marrink S-J, Sakmar TP. G protein-coupled receptors self-assemble in dynamics simulations of model bilayers. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129:10126–10132.
32. Waring, RB., May, GS., & Morris, N.R. 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA*

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)