

PRACTICO DE BIOLOGÍA MOLECULAR- Introducción general

Año 2009

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE PrnA, EL REGULADOR ESPECÍFICO DE LA VÍA DE UTILIZACIÓN DE PROLINA EN *Aspergillus nidulans*

Durante este curso práctico, se llevará a cabo la caracterización de una serie de mutantes del regulador específico de la vía de utilización de la prolina del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Para ello, se utilizarán técnicas básicas de biología molecular: PCR, clonado, secuenciación, Southern blotting.

Introducción

A. nidulans es un hongo filamentoso de la familia de los ascomicetos, capaz de utilizar un amplio espectro de compuestos como fuente de nitrógeno.

Como en la mayoría de los hongos, *A. nidulans* utiliza de manera preferencial determinadas fuentes de nitrógeno (el amonio y la glutamina). La síntesis *de novo* de las enzimas implicadas en la utilización de una **fuentes de nitrógeno alternativa** (prolina, nitrato, ácido úrico, hipoxantina, urea, etc.) está controlada estrictamente a nivel de la transcripción (Figura 1):

- a. **Represión metabólica por nitrógeno**, operada por **AreA**. En presencia de amonio o glutamina, AreA es inoperante, por lo que no hay transcripción de los genes que codifican las enzimas de utilización de fuentes alternativas de nitrógeno.
- b. **Regulación específica de la vía**, mediada por un regulador específico, que responde a la presencia de la fuente de nitrógeno alternativa. En el caso de la prolina, ese regulador es **PrnA**.

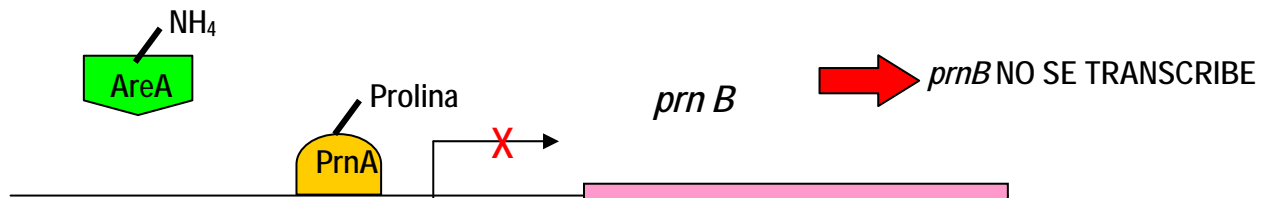
EN RESUMEN: solamente si el hongo crece en **ausencia de amonio y/o glutamina y presencia de prolina** se activarán los genes de la vía de utilización de la prolina como fuente de nitrógeno.

NOTA: Si Uds. consultan la bibliografía sobre el tema, verán que la regulación de estos genes es mucho más compleja, ya que la prolina también puede ser utilizada como fuente de carbono por *A. nidulans* y por tanto la regulación de estos genes también está supeditada a la presencia de fuentes de carbono preferenciales (glucosa). Para simplificar la comprensión de la regulación, el hongo ha sido cultivado en todos los casos en presencia de glucosa, por lo que la regulación de los genes de la vía solamente dependerá de la fuente de nitrógeno presente en el medio.

Figura 1.

Presencia de amonio o glutamina: AreA inactivo. Los genes de la vía de utilización de fuentes de nitrógeno alternativas **NO SE ACTIVARÁN**, aún en presencia de esa fuente que active el regulador específico de la vía.

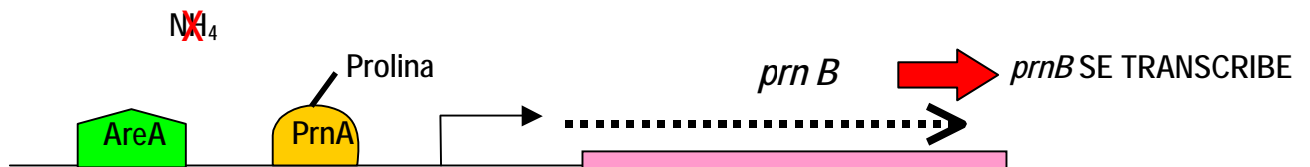
Ej. En presencia de amonio o glutamina, AreA no está activo. Por tanto, haya o no prolina en el medio (es decir, esté o no PrnA, el regulador específico de la vía, activo) **NO HABRÁ TRANSCRIPCIÓN** de *prnB*.



Ausencia de amonio, presencia de fuente alternativa de nitrógeno:

En este caso, tanto AreA como el activador específico de la vía estarán activados, por tanto **habrá inducción de los genes**.

Por ejemplo, en el caso de la vía de utilización de la prolina, en ausencia de amonio o glutamina Y presencia de prolina, tanto AreA como PrnA estarán activos, y por tanto habrá inducción de *prnB* y otros genes de la vía.



PrnA pertenece a la familia de factores de transcripción a cluster binuclear de zinc.

Los dominios a dedos de zinc son encontrados comúnmente en los motivos de unión al ADN de factores de transcripción de hongos. Hasta el momento se han encontrado tres clases de motivos, de tipo dedos de zinc: $\text{Cys}_2\text{-Cys}_2$, $\text{Cys}_2\text{-His}_2$ y Cys_6 binucleares (Zn(II)2Cys6).

Los dominios de unión al ADN de tipo Zn(II)2Cys6 (o C6 zinc) (dominios tipo "cluster" binuclear de zinc) han sido identificados solamente en hongos hasta el momento, generalmente en reguladores transcripcionales, conociéndose hasta el momento más de 80 proteínas (aisladas o predichas) que

contienen este motivo. Éstas están involucradas en variedad de procesos del metabolismo primario y secundario:

FACTOR	ORGANISMO	FUNCIÓN
Gal4p	<i>S. cerevisiae</i>	Galactose metabolism
FacB	<i>A. nidulans</i>	Acetate utilization
NirA	<i>A. nidulans</i>	Nitrogen metabolism
NIT-4	<i>N. crassa</i>	Nitrogen metabolism
Put3p	<i>S. cerevisiae</i>	Proline Utilization
Hap3p	<i>S. cerevisiae</i>	Oxygen metabolism
PrnA	<i>A. nidulans</i>	Proline utilization

El dominio de unión al ADN de las proteínas Cys6 fue caracterizado inicialmente en el factor Gal4p de *Saccharomyces cerevisiae*. Las 6 cisteínas, conservadas, forman dos alfa hélices separadas por un “loop” asociado a una prolina. Las cisteínas coordinan los dos átomos de zinc para formar una estructura en forma de trébol (cluster binuclear) (Pan & Coleman, 1990).

Los sitios de unión en el ADN consisten de trinucleótidos conservados, generalmente en una configuración simétrica, separados por un secuencia variable de longitud definida para cada proteína (por ej. GAL4 y LAC9 se unen a CGG-N₁₁.CCG; PPR1 y UAY se unen a CGG-N6-CCG (Todd & Andrianopoulos, 1997).

BUSCAR IMAGEN; Figura 2

El estudio de diversos de estos factores han permitido identificar una serie de dominios más o menos conservados entre estas proteínas y atribuir una función a cada uno de ellos: dominio de unión al ADN, dominios de activación y dominios de regulación de la actividad.

La función y estructura de PrnA han sido estudiadas en profundidad; además de las regiones que se mencionan más arriba, ha sido posible localizar una señal tripartita de entrada al núcleo, la cual está constituida por dos secuencias amino terminales básicas y una porción básica al inicio del cluster de Zn.

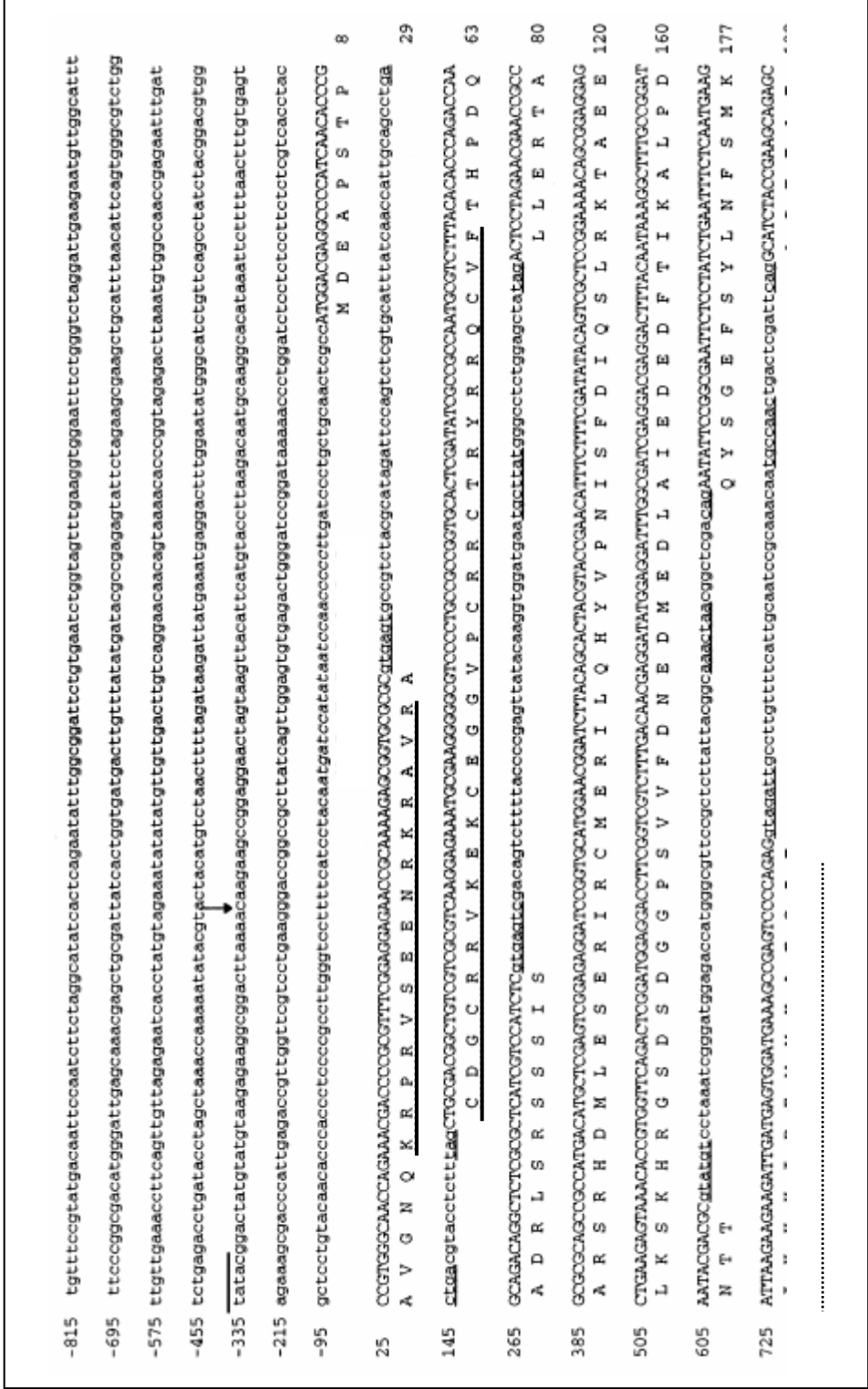
En la **Figura 3** se incluye la secuencia genómica y aminoacídica del extremo N-terminal de PrnA y la región 5'-no codificante. La secuencia completa puede encontrarse en Cazelle *et al.*, 1998.

La señal de localización nuclear y el complejo binuclear de zinc están subrayados con línea llena (aminoácidos 14 al 56).

Señal de entrada al núcleo: KRPR - RKRA - RRVK

Cluster binuclear de zinc: aminoácidos 30 al 58

Figura 2- Secuencia genómica y aminoacídica del extremo N-terminal de PrnA y la región 5'-no codificante (extraído de Figura 5 de *Cazelle et al*; 1998)



Mutantes de *prnA*

Se aislaron una serie de mutantes (que llamaremos *prnA.A*, *prnA.B* y *prnA.C*) en el crecimiento sobre prolina como fuente de nitrógeno que se han mapeado en el gen del regulador específico de la vía de utilización de la prolina, *prnA*. Estas cepas son incapaces de crecer sobre prolina o presentan un crecimiento deficiente sobre esta fuente de nitrógeno, pero crecen normalmente sobre amonio y otras fuentes de nitrógeno alternativas.

En la clase podrán observar el crecimiento de las cepas salvaje y mutantes, a las diferentes temperaturas y sobre prolina, amonio y otras fuentes de nitrógeno.

EL OBJETIVO DE ESTE TRABAJO ES LLEVAR A CABO LA CARACTERIZACIÓN DE ESTOS MUTANTES; UTILIZANDO PARA ELLO TÉCNICAS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR: PCR, CLONADO, SECUENCIACIÓN, SOUTHERN BLOTTING...

Referencias bibliográficas

- Cazelle B., Pokorska A., Hull E., Green P.M., Stanway G. & Scazzocchio C. 1998. Sequence, exon-intron organization, transcription and mutational analysis of *prnA*, the gene encoding the transcriptional activator of the *prn* cluster in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **28**: 355-370.

- Pan T. & Coleman J.E. 1990. GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 2077-2081.

- Pokorska A., Drevet C. & Scazzocchio C. 2000. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *J. Mol. Biol.* **298**: 585-596.

-Todd R.B. & Andrianopoulos A. 1997. Evolution of a fangal regulatory gene family. The Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* **21**: 388-405.