



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TMPA, UN MIEMBRO DE UNA NUEVA FAMILIA DE
PROBABLES FLAVOPROTEÍNAS DE MEMBRANA Y AFEA,
UNA PROTEÍNA TIPO CUMARATO LIGASA, REGULAN EL
DESARROLLO ASEXUAL EN *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M. en C. LOURDES GABRIELA SOID RAGGI

ASESOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el laboratorio 107-Oriente del Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La alumna Lourdes Gabriela Soid Raggi recibió apoyo económico de CONACYT, DGEP-UNAM, UC-MEXUS, Volkswagen Stiftung (Alemania) y SAGARPA CONACYT. Parte de este trabajo se financió con la subvención 2002-C01-1713 de SAGARPA-CONACYT. Se reconoce la asesoría técnica de la Biól. Alma Olivia Sánchez González durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jesús Aguirre Linares por todas sus enseñanzas y tiempo dedicado.

A mi comité tutorial: Dr. Jesús Aguirre Linares, Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Alfredo Herrera Estrella por todos sus comentarios y sugerencias durante todo el trabajo.

A los miembros del Jurado: Jesús Aguirre Linares, Dr. Roberto Coria Ortega, Dra. Alejandra Covarrubias Robles, Dr. Diego González Halphen, Dr. Wilhelm Hansberg Torres, Dr. Luis Servín González y Dr. Mario Zurita Ortega por la revisión crítica de este manuscrito.

A mis compañeros de laboratorio: Jenny Arratia, Ingrid Buchner, Nallely Cano, Laura Kawasaki, Teresa Lara, Fernando Lara, Fabián Méndez, Rosa Navarro, José Luis Ramos, Anet Rivera, Olivia Sánchez, Luis Segura e Itzel Vargas por toda su ayuda y convivencia diaria.

Al Dr. Wilhelm Hansberg y a los miembros de su laboratorio: María Chávez, Carlos Barba, Adelaida Díaz, Fernando Lledías, Leonardo Peraza, Pablo Rangel, Mauricio Ríos, Vanessa Vega y Abraham Vidal por compartir sus conocimientos.

A mis amigos del IFC: Rocío Aguilar, José Esparza, Patricia Juárez, Dulce Mata, Valentín Méndez, Gabriela Velasco, Magdalena Vilchis, Adverqueidi Zúñiga por escucharme y ayudarme a seguir adelante en los momentos más difíciles.

A Carlos por tres razones: por su apoyo en todos sentidos a lo largo de este trabajo; por siempre escucharme y animarme para continuar y finalizar este trabajo; y simplemente porque lo amo.

A David, mi pequeño, por existir y enseñarme con su curiosidad y alegría todos los días. A mi nuevo bebita(o?) por acompañarme todo el tiempo en la parte final de este trabajo.

A mi mamá por siempre confiar en mí y enseñarme a perseverar.

RESUMEN GENERAL

El hongo *Aspergillus nidulans* es un buen modelo genético para estudiar la diferenciación celular, ya que presenta un ciclo de vida con fases de diferenciación tanto sexual como asexual. La diferenciación asexual o conidiación es un proceso gradual que depende del factor transcripcional BrlA, el cual regula la expresión de varios genes. Existen cepas mutantes afectadas en distintas etapas de la conidiación. En particular, nos hemos interesado en las mutantes de apariencia algodonosa (“fluffy”) que se caracterizan por esporular tardíamente y en menor proporción que una cepa silvestre. Mediante el estudio de estas mutantes algodonosas se han identificado genes que participan en la regulación de la conidiación y del crecimiento y se pueden agrupar en dos vías principales. La vía *fluG*, compuesta por los genes *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, regula positivamente la conidiación. La vía *fadA-flbA* regula positivamente el crecimiento e inhibe la conidiación.

En este trabajo identificamos dos nuevos genes que regulan la conidiación, los cuales hemos denominado *tmpA* y *afeA* y cuya eliminación produce un fenotipo algodonoso. El gen *tmpA* codifica para una proteína transmembranal con posibles sitios de unión para el NAD(P), el FAD y tal vez un grupo hemo. La localización de una fusión TmpA-GFP sugiere que TmpA se encuentra en la membrana plasmática. El gen *afeA* codifica para una proteína citoplásmica, miembro de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato o acil-AMP-transferasas. Específicamente, AfeA se parece a las enzimas tipo cumarato ligasa. En las plantas, las cumarato ligasas participan en la síntesis de los fenilpropanoides, metabolitos secundarios que incluyen diversos compuestos flavonoides. Los flavonoides funcionan como señales de estrés o como moduladores de la interacción entre las plantas y otros organismos.

Las mutantes nulas $\Delta afeA$ y $\Delta tmpA$ expresan poco y en forma retrasada al gen *brlA*. La expresión de los genes *tmpA* y *afeA* se mantiene en niveles relativamente constantes a lo largo del desarrollo y aumenta en condiciones de carencia de nitrógeno. Además estos genes se requieren para esporular en respuesta a la carencia de una fuente de nitrógeno, pero son dispensables para esporular en respuesta a la carencia de fuente de carbono. Los genes *tmpA* y *afeA* constituyen una nueva vía de regulación de la conidiación que es independiente de *fluG*, ya que mutantes dobles [$\Delta fluG \Delta tmpA$] y [$\Delta fluG \Delta afeA$] muestran un fenotipo algodonoso más intenso que las mutantes sencillas y la conidiación se ve severamente reducida. Además, la sobre-expresión del gen *fluG* induce la conidiación aún en fondos genéticos $\Delta tmpA$ o $\Delta afeA$. El fenotipo algodonoso de las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$ se suprime al crecerlas junto a una cepa silvestre o a una mutante $\Delta fluG$, aún si se evita el contacto directo entre las hifas. Más aún, los defectos en la conidiación se suprimen parcialmente al crecer estas mutantes en un medio en el cual se hizo crecer una cepa silvestre.

Por otro lado, la sobre-expresión de *tmpA* induce la conidiación en medio líquido. El único homólogo de *tmpA* en *A. nidulans*, el gen *tmpB*, codifica para una proteína formada por un dominio de acil-AMP-transferasa, de la misma superfamilia que AfeA, fusionado a un dominio semejante a TmpA. Basados en nuestros resultados, proponemos que AfeA y TmpA funcionan secuencialmente en la biosíntesis de un compuesto tipo p-cumaril-CoA y en su posterior oxidación (o reducción). Dicho compuesto funcionaría como una señal inductora de la esporulación o como un precursor de la misma. Aunque en número muy reducido, las mutantes [$\Delta fluG \Delta tmpA$] y [$\Delta fluG \Delta afeA$] son capaces de producir esporas, lo cual sugiere la existencia de al menos una tercera vía capaz de regular la conidiación. Es posible que en *A. nidulans* y en otros hongos se requiera la interacción de dos o más señales para regular la esporulación eficientemente en el tiempo y en el espacio.

GENERAL SUMMARY

The fungus *Aspergillus nidulans* is a good genetic model to study cell differentiation, as its life cycle presents both asexual and sexual phases of differentiation. Asexual differentiation or conidiation is a gradual process that depends on the transcription factor encoded by the *brlA* gene, which is needed for the expression of a number of genes. There are several mutants affected in different stages of conidiation. We are particularly interested in mutants with a “fluffy” or cotton-like appearance and characterized by showing both, delayed and reduced sporulation, as compared to the wild type strain. The study of different “fluffy” mutants has allowed identification of several genes involved in regulation of growth and conidiation, which can be grouped in two main pathways. The *fluG* pathway, composed by genes *flbB*, *flbC*, *flbD* and *flbE*, regulate conidiation positively. The *fadA-flbA* pathway regulates growth positively and inhibits conidiation.

In this work we have identified *tmpA* and *afeA* as two new genes involved in the regulation of conidiation and whose inactivation produce a fluffy phenotype. The *tmpA* gene encodes a putative transmembrane protein with possible NAD(P), FAD and perhaps a haem-binding sites. The localization of a TmpA-GFP fusion suggests that TmpA is located at the plasma membrane. The *afeA* gene predicts a cytoplasmic protein, belonging to the superfamily of adenylate forming enzymes or acyl-AMP transferases. Specifically, AfeA is similar to coumarate ligase-like enzymes. In plants, coumarate ligases participate in the synthesis of phenylpropanoids, which are secondary metabolites that include different flavonoid compounds. Flavonoids work as stress signals or as modulators of some interactions between plants and other organisms.

The *brlA* gene is expressed late and scarcely in $\Delta afeA$ and $\Delta tmpA$ null mutants. The expression of *tmpA* and *afeA* is maintained at relatively constant levels along development but it is increased during nitrogen starvation.

Furthermore, these genes are required to sporulate in response to nitrogen starvation, but are dispensable to sporulate in response to carbon starvation. *tmpA* and *afeA* genes define a new *fluG*-independent conidiation pathway, since double mutants [*fluG tmpA*] and [*fluG afeA*] show an additive fluffy phenotype and severely reduced conidiation. In addition, *fluG* overexpression induces conidiation even in $\Delta tmpA$ or $\Delta afeA$ genetic backgrounds. The fluffy phenotype of $\Delta tmpA$ or $\Delta afeA$ mutants is suppressed when they are grown next to wild type or $\Delta fluG$ mutant strains, even if direct contact between hyphae is prevented. Moreover, conidiation defects are partially suppressed when these mutants are grown in a medium previously used to grow a wild type strain.

The overexpression of *tmpA* induces conidiation in liquid medium. The only *tmpA* homologue present in *A. nidulans*, the *tmpB* gene, encodes a protein with an additional acyl-AMP-transferase domain that as AfeA, belong to the same protein superfamily. Based in our results, we propose that AfeA and TmpA work sequentially in the biosynthesis of a compound of the p-cuomaryl-CoA type and its oxidation. This compound could work as a sporulation inducing signal or its precursor. The fact that [*fluG tmpA*] and [*fluG afeA*] mutants are able to produce spores, even if in very reduced numbers, suggests the existence of at least another pathway to regulate conidiation. It is possible that in *A. nidulans* and other fungi the interaction of two or more signals is required to efficiently regulate sporulation in time and space.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La biología de *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso, multicelular que crece como un conjunto de hifas o células cilíndricas que miden de 2 a 5 μm de diámetro. Estas hifas se ramifican y forman una red no diferenciada de células interconectadas que en conjunto se llama micelio. Los filamentos son septados, aunque tiene poros suficientemente grandes para permitir el paso de organelos. Como posee varios núcleos en un citoplasma común, se considera un organismo cenocítico (Ward, 1991). Es un hongo saprófito y cosmopolita, que vive principalmente en el suelo. Se ubica dentro del Phylum Ascomycota porque forma las esporas sexuales dentro de unos sacos llamados ascas. Pertenece al orden de los Eurotiales, donde se encuentran los mohos azules y verdes, dentro de la familia Trichocomaceae.

A. nidulans es un organismo que en su ciclo de vida presenta una fase reproductiva sexual o ascosporogénesis y una fase reproductiva asexual o conidiación (Fig.1) (Timberlake *et al.*, 1980). La fase sexual suele ocurrir después de la fase asexual (Zonneveld, 1977). En este hongo los sexos no están separados, es decir, es un organismo homotálico, por lo que la fase sexual puede ocurrir entre dos cepas distintas o entre una misma cepa. Esta fase ocurre generalmente en condiciones de aereación restringida. En estas condiciones ciertas hifas vegetativas especializadas o ascogonias se enrollan y fusionan para formar una hifa dicariótica. La hifa dicariótica contiene dos núcleos muy cercanos entre sí. Estos núcleos se dividen sincrónicamente y la hifa dicariótica se propaga y forma un solo primordio. También se forman

células “nodrizas” o células Hülle. Estas últimas parecen ayudar a la maduración del primordio que es el paso previo a la formación del cleistotecio. La formación del primordio involucra el desarrollo coordinado de dos tipos de tejidos: el tejido ascógeno y el tejido estéril. El tejido ascógeno da origen a las ascosporas y el tejido estéril son hifas que envuelven al tejido ascógeno y que dan origen a la pared del cleistotecio que se llama peridio. Al madurar el primordio, la fase sexual se completa y se forma el cuerpo fructífero o ascocarpo llamado cleistotecio, el cual tiene una forma esférica con un diámetro de 0.1 a 0.5 mm de diámetro. Dentro del cleistotecio ocurre la cariogamia y transitoriamente se forma un diploide que se divide por meiosis. En cada cleistotecio hay miles de ascas, aproximadamente 10,000. La meiosis origina 4 esporas sexuales o ascosporas en cada asca, las cuales presentan una división mitótica para finalmente formar 8 ascosporas. Antes de madurar las ascosporas se dividen por una segunda mitosis, por lo cual las ascosporas son binucleadas. La germinación de las ascosporas da origen a un micelio homocariote haploide.

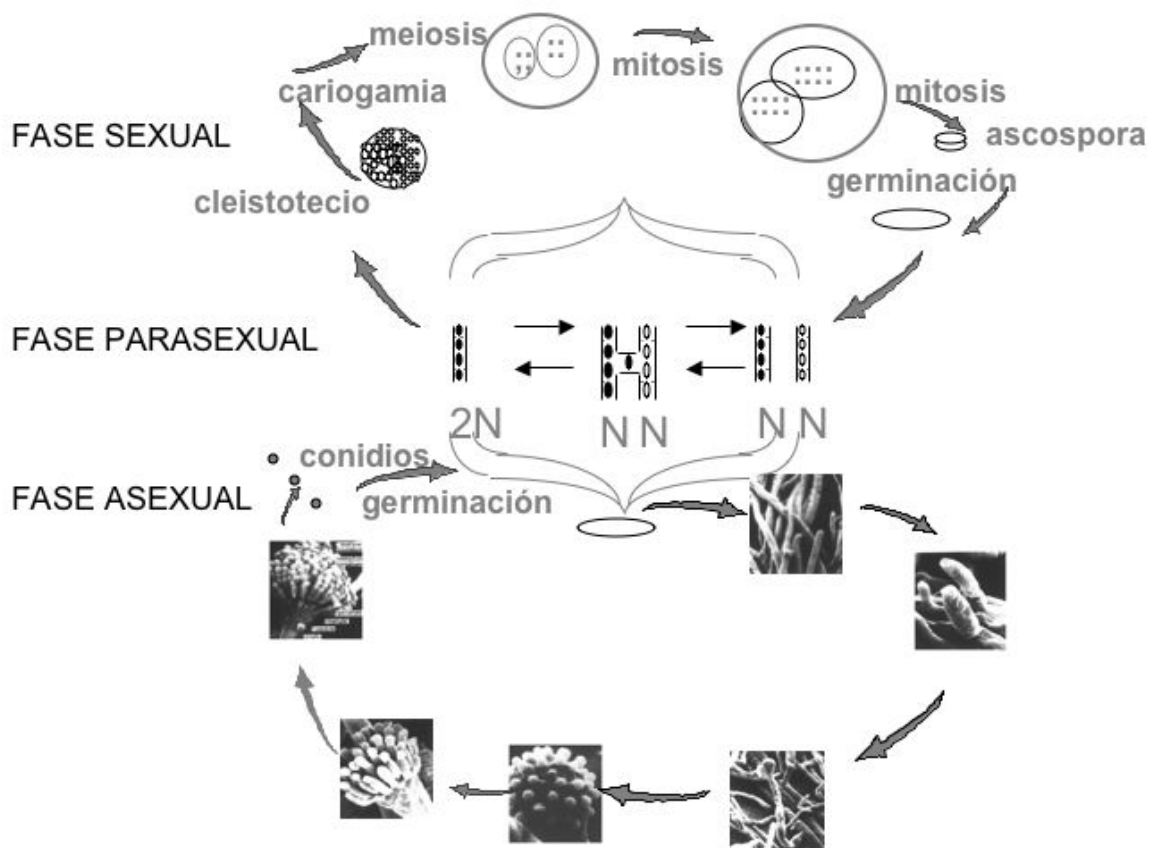


Figura 1. Ciclo de vida de *A. nidulans*. Modificado de Aguirre (1992). En la parte superior se observan los pasos principales de la fase sexual, en ella se forma el cleistotecio donde ocurre la meiosis y se originan las ascosporas o esporas sexuales. En el centro se observan los homocariotes, heterocariotes y diploides que se forman en el ciclo parasexual. En la parte inferior se observan las etapas del ciclo asexual o conidiación, en donde una hifa aérea da origen a un conidióforo que produce cadenas de esporas asexuales o conidios.

La fase asexual a su vez se puede dividir en dos distintos procesos: el crecimiento y la reproducción. La germinación de una ascospora o de una espora asexual, llamada conidio, da lugar a hifas que se ramifican para formar el micelio. Después de determinado tiempo, algunas de las hifas sufren lo que se conoce como desarrollo de la competencia o capacitancia (Axelrod *et al.*, 1973). Estas células inician el desarrollo al exponerse al aire. De esta forma comienza la formación de la célula pie, la cual da origen al micelio aéreo, la vesícula, la métula, la fiálide y finalmente el conidióforo que produce cadenas largas de miles de conidios uninucleados. Los mecanismos que controlan la adquisición de la

competencia, el crecimiento no diferenciado y el desarrollo del conidióforo son complejos. Este trabajo se centra en entender los mecanismos que regulan el inicio del desarrollo asexual o conidiación.

1.2. *Aspergillus nidulans* como modelo experimental

La conidiación en *Aspergillus nidulans* es buen modelo para estudiar la diferenciación celular (Pontecorvo, 1953; Timberlake y Marshall, 1988; Aguirre, 1992). Algunas de las ventajas de este modelo, se deben a que *A. nidulans* es un organismo con un tiempo de duplicación corto, de aproximadamente 2.5 horas. Además crece en medios definidos o completos, tanto en líquido como en sólido (Martinelli, 1994). En medio sólido forma colonias individuales de simetría radial que crecen a una tasa de 0.5 mm/h a 37°C (Lee y Adams, 1994). Al esporular, los conidióforos más viejos se encuentran en el centro de la colonia y los nuevos se van formando en los extremos de la colonia. La conidiación es fácilmente observable macroscópicamente debido a la coloración de los conidios. Los conidios son estructuras no esenciales, por lo que es posible obtener mutantes afectadas en diversas etapas de la conidiación. También, existen muchas mutantes auxotróficas afectadas en diferentes vías metabólicas, las cuales se pueden identificar fácilmente. Los conidios son uninucleados, lo que permite realizar mutagénesis y aislar directamente las mutantes de interés (Pontecorvo *et al.*, 1953; Timberlake y Marshall, 1988; Aguirre, 1992).

Otras de sus ventajas es que su genoma es relativamente pequeño, de 2.4×10^7 pb, dividido en 8 cromosomas. Actualmente, su genoma está secuenciado totalmente y se cuenta con bibliotecas genómicas y de cDNA. Este hongo se puede transformar fácilmente por fusión de protoplastos, por electroporación y por integración mediada por enzimas de restricción o REMI (Sánchez y Aguirre, 1996; Sánchez y Aguirre, 1998). Actualmente existe una mutante afectada en la recombinación no-homóloga, lo cual permite la

integración de DNA exógeno de manera sitio-específica (Nayak *et al.*, 2006). Esto hace posible obtener mutantes específicas de forma más eficiente y rápida.

A. nidulans presenta además un ciclo parasexual (Fig 1). De esta forma puede formarse un micelio con un solo tipo de núcleos que se llama homocariote, o un micelio con núcleos genéticamente diferentes que se llama heterocariote. Los heterocariotes se obtienen al cocultivar homocariotes diferentes y aplicar una presión selectiva. Las hifas se fusionan espontáneamente por anastomosis y la selección de marcadores genéticos complementarios permiten mantener el heterocariote por períodos indefinidos. A partir del heterocariote se puede formar espontáneamente un diploide. El diploide se puede haploidizar nuevamente con agentes que inhiben la polimerización de los microtúbulos, tales como el benomil o la p-fluorofenilalanina. Estos compuestos interfieren con la segregación de los cromosomas durante la mitosis. De esta forma mediante el ciclo parasexual se pueden generar haploides “recombinantes”. Esto permite la asignación de genes a un determinado cromosoma, así como el análisis de alelismo y dominancia. La fase sexual permite el análisis genético tradicional, como por ejemplo crear mutantes múltiples por recombinación y determinar la ubicación de nuevos genes a genes definidos previamente (Pontecorvo *et al.*, 1953).

I.3. La conidiación en *A. nidulans*

En medio sólido, el proceso de conidiación se inicia aproximadamente 16 horas después de la germinación de la spora. Se inicia cuando en las hifas vegetativas se forma un compartimiento septado de paredes gruesas que se llama célula pie. En colonias asexualmente maduras la célula pie se distingue porque presenta paredes dobles. La pared externa es continua con el resto del micelio y la interna es única de la célula pie (Mims *et al.*, 1988). La célula pie genera una hifa aérea o tallo de 4 a 5 μm de diámetro que no se ramifica. A

diferencia, las hifas vegetativas tienen un diámetro de 2 a 3 μm , se ramifican y crecen indefinidamente. Las hifas aéreas solo crecen aproximadamente 100 μm , después de lo cual el crecimiento se detiene y forman una vesícula multinucleada. Por gemación, la vesícula da origen a una capa de aproximadamente 60 células uninucleadas llamadas métulas o esterigmatas primarias. Las métulas sufren una división y producen alrededor de 160 células fiálides o esterigmatas secundarios. Las fiálides sufren gemaciones sucesivas hasta originar cadenas largas de conidios, produciéndose aproximadamente 100 conidios por fiálide. Después de cada división, el núcleo de cada conidio se detiene en la fase G0 del ciclo celular. Los conidios más nuevos desplazan a los conidios más viejos. El tiempo que se requiere desde el inicio del crecimiento de la hifa aérea hasta la formación del primer conidio es de aproximadamente 6 a 8 horas (Champe y Simon, 1992)

I.4. La fisiología de la conidiación

En *A. nidulans*, y muchos otros hongos, el estado vegetativo o hifa se puede mantener continuamente en cultivos sumergidos con suficientes nutrientes. Después, la diferenciación celular se puede inducir sincrónicamente por exposición al aire (Axelrod, 1972). La transferencia del micelio de un cultivo líquido a un cultivo sólido se le llama inducción, la cual inicia y sincroniza el desarrollo asexual (Timberlake, 1980). El tiempo requerido para la aparición del primer conidióforo es de aproximadamente 5 horas después de exponer al aire un micelio crecido por 18 horas en medio líquido. El tiempo de inicio de la esporulación es inversamente proporcional al tiempo de crecimiento en medio líquido. Esto sugiere que las células requieren de aproximadamente 18 horas de crecimiento antes de ser capaces para responder a la señal inductora del aire.

Es importante señalar que la falta de conidiación en cultivo sumergido no es absoluta y es dependiente de la composición del medio y de la cepa. En cultivo

sumergido sin nutrientes se puede inducir el desarrollo asexual. Una cepa silvestre en ausencia de carbono forma conidióforos con una morfología reducida, mientras que en ausencia de nitrógeno forma conidióforos completos (Skromne *et al.*, 1995). Además del aire en medio sólido y de la carencia de nutrientes en medio líquido, existen otras señales ambientales necesarias para la diferenciación. Estas señales ambientales que regulan la conidiación son por ejemplo, la osmolaridad y la densidad celular. Por lo tanto parece haber varios estímulos independientes, pero aditivos que contribuyen a la conidiación.

Además de las señales ambientales se han caracterizado algunas señales extracelulares autócrinas. Estas señales las usan algunos microorganismos para controlar diversos aspectos del desarrollo y otros procesos celulares (Kim y Kaiser, 1990; Willey *et al.*, 1991). Algunas especies de hongos producen moléculas que funcionan como feromonas para regular el apareamiento sexual. Por ejemplo, se han encontrado terpenoides como el ácido trispórico en los Zygomycetes Mucorales, el anteridiol en el Oomycete *Achlya* y la sirenina en los Allomycetes. Otras son hormonas peptídicas, tales como los factores “ α ” y “a” de *S. cerevisiae* (Gooday, 1983).

En *A. nidulans* se han descrito compuestos genéricamente llamados oxilipinas, que se derivan de ácidos grasos no saturados de 18 carbonos. Colectivamente se les llama factores psi, “precocious sexual inducers”, ya que modulan la esporulación sexual y asexual (Champe *et al.*, 1987; Mazur *et al.*, 1990). El factor psi se compone de ácido linoléico hidroxilado, ácido oléico hidroxilado y ácido linolénico, identificados como $\text{psi}\alpha$, $\text{psi}\beta$ y $\text{psi}\gamma$, respectivamente (Champe y El-Zayat, 1991; Busch *et al.*, 2003; Tsitsigiannis *et al.*, 2004). La posición de los grupos hidroxilo sobre el esqueleto del ácido graso define el componente: 8'-hidroxi define a psiB ; 5',8'-dihidroxil define a psiC y un anillo de lactona en la posición 5' define a psiA . Los factores $\text{psiB}\alpha/\beta$ y $\text{psiC}\alpha$ funcionan como efectores positivos de la esporulación sexual e inhiben la conidiación (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). El factor $\text{psiA}\alpha$ antagoniza a psiB y psiC

y, por lo tanto, inhibe la esporulación sexual (Mazur *et al.*, 1990). Estas observaciones sugieren que *psiA* activa la esporulación asexual. Por lo tanto, se ha sugerido que el balance entre la diferenciación sexual y asexual se determina por la abundancia relativa de *psiA*, en comparación con *psiB* y *psiC*. Por otro lado, el gen *fluG* participa en la síntesis de otro factor extracelular que regula la esporulación (Lee y Adams, 1994).

I.5. Regulación genética de la conidiación

La conidiogénesis es un proceso que implica la expresión de un gran número de genes. Por análisis mutacional, Martinelly y Clutterbuck estimaron que en la conidiación participan entre 45 y 100 genes (1971). En contraste, Timberlake (1980) mostró que, aproximadamente, 1200 mRNA se acumulan preferencialmente durante la conidiación. Esta discrepancia puede explicarse porque algunos genes que se expresan tienen funciones redundantes. Además algunos mRNA que están presentes a altos niveles en la conidiación, participan también en algunos aspectos del crecimiento y del metabolismo. Los principales genes que participan en la regulación temprana de la conidiación son *brlA*, *abaA* y *wetA* (Fig. 2). La inactivación de *brlA* impide la expresión de *abaA* y *wetA*, y la inactivación de *abaA* impide la expresión de *wetA* (Boylan *et al.*, 1987; Mirabito *et al.*, 1989).

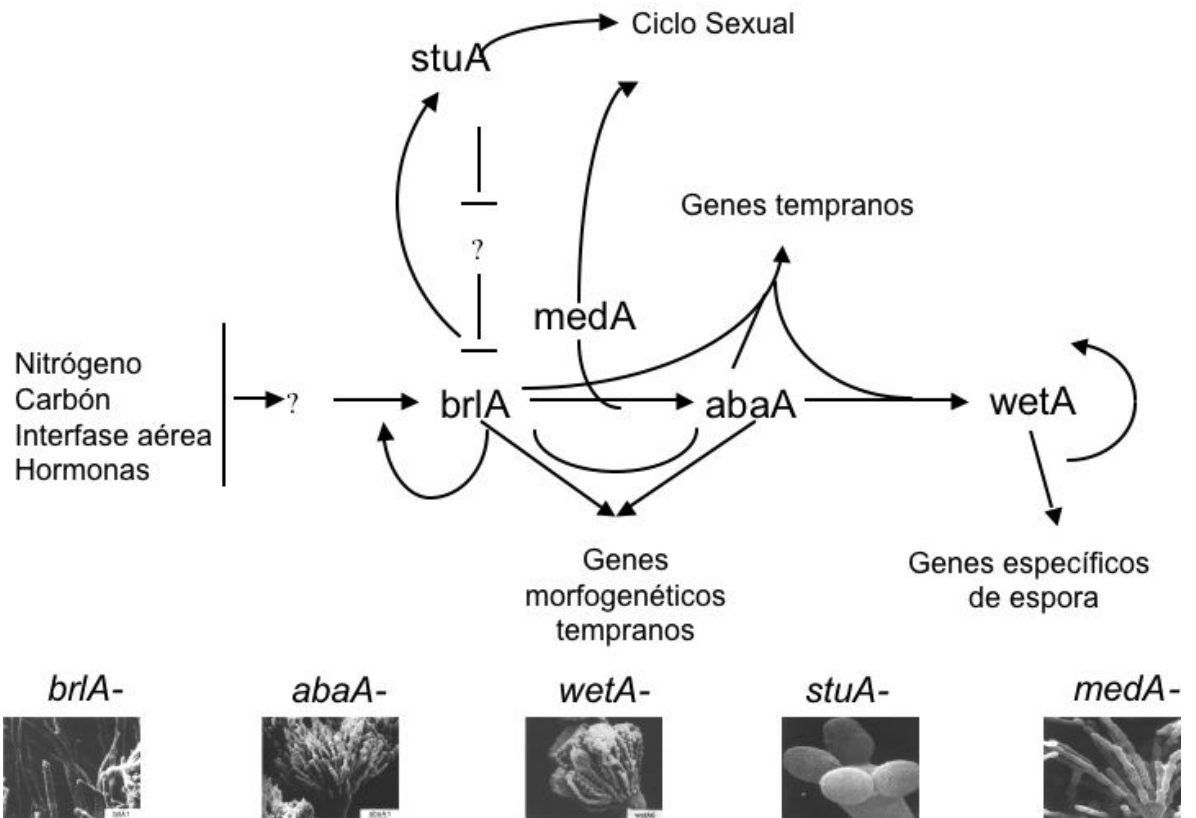


Figura 2. Modelo de las interacciones genéticas que controlan el desarrollo asexual (parte superior), tomado de Aguirre, (1993). Microscopías electrónicas de barrido de las mutantes afectadas en los principales reguladores de este proceso (parte inferior).

1.5.1. El gen *brlA* es el regulador esencial de la conidiación

El proceso de la conidiación se regula por el gen *brlA* (Clutterbuck, 1969; Adams *et al.*, 1988) (Fig.2). Este gen se encuentra en el cromosoma VIII y codifica para un polipéptido de 432 residuos parecido a los factores transcripcionales del tipo dedos de zinc, como TFIIIA. Se aisló por complementación de una mutante *brlA* (Johnstone *et al.*, 1985). Las mutantes en este gen forman tallos de conidióforos que crecen de 20 a 30 veces más altas que las cepas silvestres (Adams *et al.*, 1998) (Fig.2). Estas mutantes no forman vesículas, métulas, fiálides, conidios (Clutterbuck, 1969), por lo cual se les llamó *bristle* por solamente formar *bristles* o cerdas.

La fusión del gen *brlA* con el promotor del gen para la alcohol deshidrogenasa (*alcA*), el cual se regula nutricionalmente, induce la expresión de *brlA*. Al crecer a las células en treonina o alcohol como única fuente de carbono se induce la expresión de *brlA*. Al crecer a las células en glucosa se reprime la expresión de *brlA* (Lockington *et al.*, 1985; Gwynne *et al.*, 1987). En estas condiciones, la sobre-expresión forzada de *brlA* detiene el crecimiento apical de las hifas e induce el desarrollo de conidióforos morfológicamente reducidos y la producción de esporas viables a partir de las puntas de algunas hifas (Adams *et al.*, 1988).

El polipéptido BrIA contiene una secuencia repetida que se asemeja a proteínas tipo dedos de zinc C₂H₂. Mutaciones que cambian estas cisteínas por serina eliminan la actividad de *brlA* (Adams *et al.*, 1990). También se han aislado mutantes dominantes con el fenotipo *bristle*, en las cuales el ácido glutámico 407 se sustituye por una glicina (Wieser *et al.*, 1997). Aunque no se han encontrado otros ejemplos de mutaciones dominantes en las proteínas con dedos de zinc, esto sugiere que el carboxilo terminal de BrIA desempeña un papel importante en su función. Posiblemente, esta región hace contacto con la maquinaria de la transcripción basal y es necesaria para la iniciación de la transcripción.

El mRNA de *brlA* se encuentra en niveles no detectables en las hifas no diferenciadas y se acumula durante la conidiación. El gen *brlA* expresa dos transcritos que se sobrelapan: *brlA α* y *brlA β* (Fig.3). La transcripción de *brlA β* se inicia 1 kpb río arriba de *brlA α* , la transcripción de *brlA α* se inicia en la secuencia intrónica de *brlA β* . El transcrito *brlA α* codifica para un polipéptido de 432 residuos. El transcrito *brlA β* codifica para dos marcos de lectura. Uno es pequeño, de 41 codones, y se llama μ ORF. El otro está río abajo y codifica para un polipéptido de 455 aminoácidos, de forma que tiene 23 aminoácidos más en el extremo amino terminal que el transcripto *brlA α* . Mutaciones que bloquean la expresión de cualquier transcrito causan un desarrollo anormal (Prade y Timberlake, 1993). Sin embargo, copias múltiples de cualquiera de los

dos transcritos compensan la pérdida del otro. Esto sugiere que *brlA α* y *brlA β* se requieren individualmente para el desarrollo normal, pero sus productos tienen funciones redundantes. La sobre-expresión de *brlA β* provoca la acumulación del mRNA de *brlA α* , pero la sobre-expresión de *brlA α* no causa la acumulación de *brlA β* . Además, los transcritos *brlA α* y *brlA β* se acumulan de diferente manera. El transcrito de *brlA β* se detecta en células vegetativas antes de la inducción del desarrollo, pero no se acumula. Una hipótesis sugiere que la traducción del μ ORF evita la traducción de *brlA β* en células vegetativas, lo cual evita el desarrollo (Han *et al.*, 1993). En efecto, al eliminar el μ ORF hay expresión de *brlA β* en las hifas y ocurre la esporulación en condiciones inapropiadas. Se propone que al inducir el desarrollo asexual, la represión traduccional de *brlA* se elimina a través de factores regulatorios desconocidos. Esto permitiría la traducción de *brlA β* . Por lo que tal vez, la conidiación se regule cambiando el sitio de inicio de la traducción del AUG del μ ORF al AUG de *BrIA β* . Sin embargo, al sobre-expresar *brlA β* con o sin el μ ORF hay conidiación en cultivos vegetativos. Otra posibilidad es que el aumento de la transcripción de *brlA β* sea suficiente para causar la esporulación. En cualquier caso, después de la traducción de *brlA β* , se activa la transcripción de *brlA α* por un mecanismo de retroalimentación positiva. Esto involucra al mismo *BrIA* y a otros factores de transcripción como *AbaA* (Aguirre, 1993). De esta forma la expresión de *brlA β* se regula a nivel transcripcional y postranscripcional. La expresión de *brlA α* se regula a nivel transcripcional y su expresión, al menos parcialmente, depende de *brlA β* .

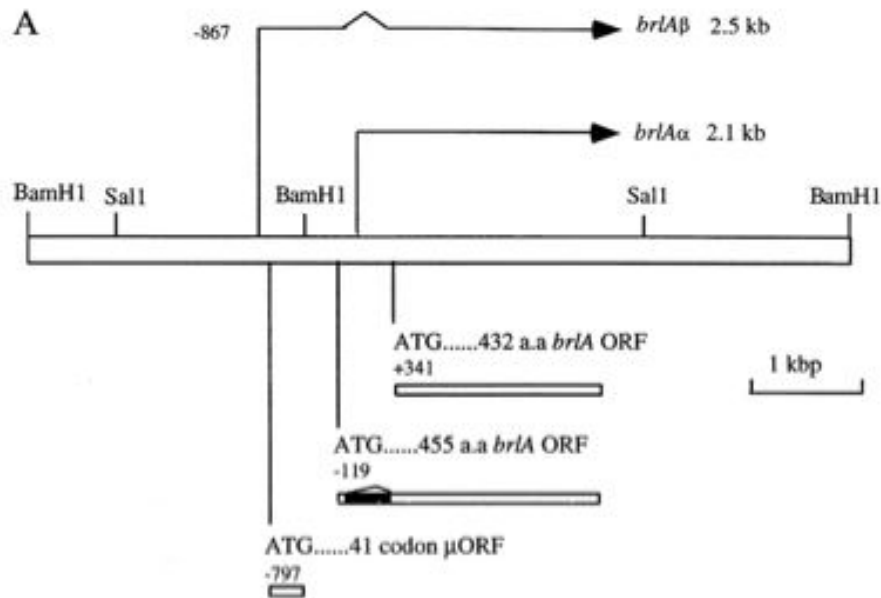


Figura 3. Organización del locus *brlA*. Tomado de Han y Adams, 2001.

La expresión de *brlA* también se modula por condiciones de estrés nutricional. Por ejemplo, la carencia de glucosa u otras fuentes de carbono provocan que el mensajero de *brlA* se acumule rápidamente y a niveles muy altos (Skromne *et al.*, 1995). A diferencia, la presencia de una fuente de carbono inhibe la transcripción de *brlA*. Por su parte, la carencia de nitrógeno tiene un efecto menos pronunciado en la acumulación del mRNA de *brlA* (Skromne *et al.*, 1995). Estos datos indican que la carencia de fuentes de carbono o nitrógeno inducen la expresión del gen *brlA* por vías independientes.

1.5.2. El gen *abaA* es un *regulador* transcripcional de la fase intermedia de conidiación

Después de *brlA* se expresa el gen *abaA*, el cual también es esencial para la conidiación. Las mutantes en *abaA* producen fiálides anormales ramificadas que no presentan gemación de conidios y que asemejan cadenas de perlas, de

ahí el nombre *abacus*. (Fig. 2). El gen *abaA* también se encuentra en el cromosoma VIII y codifica para una proteína de unión al DNA, de 796 residuos, parecida al factor transcripcional TEA (Burglin, 1991). En su secuencia incluye un potencial cierre de leucinas (Aramayo y Timberlake, 1993). La sobre-expresión de *abaA* provoca la activación del gen *wetA*, que es también necesario para la conidiación, y del gen *brlA*. Asimismo, provoca que el crecimiento se detenga y que haya vacuolización, pero no se observa la formación de conidios (Mirabito *et al.*, 1989). Por lo tanto, *brlA* y *abaA* son inductores recíprocos, pero la expresión de *brlA* ocurre antes de la expresión de *abaA*. No obstante, *abaA* muestra una función compleja porque la expresión de *brlA* se incrementa en mutantes nulas en *abaA*. Un modelo para entender esto es que *AbaA* funciona como represor transcripcional de *brlA* a bajas concentraciones y como activador a altas concentraciones (Aguirre, 1993).

I.5.3. El gen *wetA* regula la fase tardía de la conidiación

Otro gen que participa en la esporulación es *wetA*. Este gen se requiere para la síntesis de los componentes de la pared celular y la producción de esporas viables (Marshall y Timberlake, 1991). El gen *wetA* se encuentra en el cromosoma VII. La mutación de *wetA* produce esporas que no se pigmentan y que se autolisan, de ahí el nombre *wet-white conidia* (Fig. 2) (Clutterbuck, 1969; Martinelli y Clutterbuck, 1971; Boylan *et al.*, 1987). Por lo tanto *WetA* se requiere para la maduración de los conidios. El polipéptido *WetA* que es de 555 residuos no muestra similitud clara en las bases de datos, pero tiene un alto contenido de serinas, treoninas y prolina. Sin embargo, como las mutantes *wetA* no acumulan mRNA específicos de espora, se ha propuesto que *wetA* codifica para un regulador transcripcional de genes específicos de espora (Boylan *et al.*, 1987). Además hay cierta similitud con coactivadores transcripcionales de mamíferos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). En células vegetativas, la sobre-expresión de *wetA* causa inhibición del crecimiento,

ramificación excesiva y expresión de genes específicos de espora, pero no provoca activación de *brlA* o *abaA* ni conidiación prematura.

1.5.4. Los genes *stuA* y *medA* son moduladores de la conidiación

Existen otros genes que son modificadores del desarrollo. Las mutantes en estos genes producen conidióforos desordenados espacialmente, pero producen algunas esporas viables. A este tipo de mutantes se les llama mutantes oligosporógenas (Clutterbuck, 1969). Uno de estos genes es *stuA*, que se encuentra en el cromosoma I y su mutación causa la producción de conidióforos enanos, ya que en muchos casos carecen de mótulas y fiálides (Fig 2). Los conidios se pueden formar directamente de la vesícula del conidióforo o a partir de esterigmatas anormales, de ahí su nombre *stunted* (Miller *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992). Además, esta mutante está afectada en el ciclo sexual, ya que es auto-estéril. El gen *stuA* codifica para un factor transcripcional de 622 residuos. StuA está relacionada con el factor transcripcional PHD1 de *S. cerevisiae* (Gimeno y Fink, 1994). La sobre-expresión de *PHD1* induce el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae*. El gen *stuA* es capaz de regular la actividad y la distribución espacial de *brlA* y de *abaA* (Aguirre, 1993). Se ha propuesto que el fenotipo de las mutantes *stuA* se debe a la expresión aberrante de *brlA* y *abaA* (Aguirre, 1993; Busby *et al.*, 1996). StuA probablemente funciona como un represor transcripcional que controla la expresión temporal de *brlA* y *abaA* (Dutton *et al.*, 1997). En *Aspergillus fumigatus* mutantes *stuA* inhiben la expresión de varios grupos de genes que, probablemente, participan en el metabolismo secundario (Sheppard *et al.*, 2005).

Otra mutante oligosporógena es la mutante en el gen *medA*, el cual codifica para un polipéptido de 658 residuos. Este gen se encuentra en el cromosoma I. El fenotipo de las mutantes *medA* se parece al de las mutantes nulas *abaA*. Estas mutantes producen múltiples capas de mótulas antes que las fiálides se

diferencien y, algunas veces forman conidióforos secundarios antes de formar a las fiálides (Fig 2). De ahí su nombre *medusa*. En estas mutantes los transcritos de *brlA* se detectan prematuramente. A diferencia de una cepa silvestre, en las mutantes *medA*, la expresión de *brlA β* continua aumentando a lo largo del desarrollo. Por lo tanto, MedA parece reprimir la expresión prematura de *brlA α* y regula la expresión de *brlA β* durante los últimos estados del desarrollo. La expresión de *abaA* está muy reducida o ausente en las mutantes nulas *medA*, por lo que junto con BrIA, MedA parece ser un coactivador de AbaA. El fenotipo de ciertas mutantes *medA* se suprime con una copia extra de *brlA*, por lo que MedA probablemente estabiliza los niveles del mensajero de *brlA* (Miller *et al.*, 1993).

1.5.5. El gen *veA* es un regulador del desarrollo dependiente de la luz

En cepas silvestres, la ausencia de la luz provoca una conidiación escasa y la producción de muchas hifas aéreas (Mooney y Yager, 1990). Por el contrario, la incubación en presencia de luz blanca produce la formación de muchos conidióforos con abundantes conidias. En cepas silvestres, la conidiación se induce por exposición a la luz roja, de 680 a 710 nm y se suprime en la obscuridad. Tampoco hay conidiación en luz con longitudes de onda abajo de 500 nm. Un pulso de luz roja dado entre 0 y 6 horas después de la inducción del desarrollo por exposición al aire es suficiente para provocar conidiación. Pulsos de luz después de las seis de la inducción del desarrollo no provocan conidiación. Por lo tanto, hay un período de fotosensibilidad.

El gen *velvet* o *veA*, codifica para un polipéptido de 573 residuos que se encuentra en el cromosoma VIII, el cual se requiere para conidiar en respuesta a la luz roja. Las cepas silvestres *veA*⁺ muestran conidiación dependiente de la luz., mientras que las cepas con la mutación *veA1* conidian en presencia de la luz o en la obscuridad (Mooney *et al.*, 1990). Por lo que no hay diferencia en el

fenotipo de una cepa *veA1* crecida en la luz o la obscuridad o entre una cepa *veA*⁺ crecida en luz continua.

La mutación *veA1* muestra efectos pleiotrópicos, las mutantes *veA1* no producen tantas hifas aéreas como las cepas silvestres en la obscuridad y muestran una vigorosa conidiación tanto en luz como en la obscuridad (Kafer, 1965). Además son acleistoteciales a temperatura alta, 42°C. En presencia de la luz la formación de los cleistotecios se retrasa y el hongo se desarrolla asexualmente. En la obscuridad, el desarrollo se dirige hacia el estado sexual, formando cleistotecios (Mooney y Yager, 1992). En condiciones que inducen el desarrollo sexual, cepas sin *veA* (ΔveA) son incapaces de desarrollar estructuras sexuales. Por lo tanto, *veA* se requiere para la formación de cleistotecios y de ascosporas (Kim *et al.*, 2002). La proteína VeA posee motivos o dominios que se identifican como secuencias para el transporte al núcleo. En la obscuridad se localiza principalmente en el núcleo, mientras que en la luz se localiza en el citoplasma. En la mutante *veA1*, la proteína VeA carece de los primeros 37 aminoácidos y se localiza en el citoplasma, independientemente de la presencia o ausencia de luz (Stinnett *et al.*, 2006).

1.6. La regulación genética temprana del gen *brlA* y las mutantes algodonosas

A diferencia de las mutantes afectadas en *brlA*, *abaA*, *wetA*, *stuA* o *medA* existen genes, cuya mutación solamente afecta la conidiación parcialmente (Tamame *et al.*, 1983; Adams *et al.*, 1992). Una de las características principales de este tipo de mutantes es que forman colonias de aspecto algodonoso o lanoso. Debido a esto se conocen genéricamente como mutantes “*fluffies*”. Las mutantes “*fluffies*” son capaces de formar conidióforos normales, pero lo hacen entre 24 y 48 horas después que una cepa silvestre y en menor número con respecto a una cepa silvestre. Por lo tanto, estas mutantes parecen

estar alteradas en su habilidad para iniciar el desarrollo. Además, las mutantes algodonosas presentan gran proliferación de hifas no diferenciadas, y sus colonias presentan un diámetro más grande, ya que presentan menor inhibición del crecimiento por contacto. Sin embargo, no incrementan su masa seca total, lo cual sugiere que tienen un patrón diferente de crecimiento y no un mayor crecimiento total (Adams *et al.*, 1992).

En 1970, Gordon Dorn aisló y caracterizó genéticamente varias de estas mutantes, las cuales desafortunadamente no se depositaron en ninguna colección. Posteriormente, para tratar de entender los factores que se requieren para la activación del gen *brlA*, se aislaron mutantes *fluffy* mutagenizando a saturación con 1-óxido-4-nitroquinolina (NSQ) (Wieser *et al.*, 1994). Las mutantes algodonosas resultantes se clasificaron en tres clases principales según el grado de expresión de *brlA*. La clase I, incluye mutantes en las que la expresión de *brlA* es baja, menos del 5% y se les llamó mutantes FLB (*fluffy low brlA*) (Wieser *et al.*, 1994). La clase II, incluye mutantes en las que la expresión de *brlA* es moderada, aproximadamente el 25%, y se les llamó mutantes FMB (*fluffy medium brlA*). Finalmente, la clase III, incluye mutantes en las que la expresión de *brlA* es cercana a la silvestre, las cuales se denominaron FHB (*fluffy high brlA*).

Los genes definidos por las mutantes de la clase I, según Wieser *et al.*, (1994), se dividieron a su vez en tres grupos (Fig. 4). En el primer grupo se encuentran mutantes totalmente aconidiales en medio completo, pero capaces de conidiar un poco en medio mínimo. Además en éstas se puede inducir a conidiación cuando se crecen junto a una cepa silvestre o a una mutante de otra clase y producen un pigmento color naranja. En un segundo grupo se ubican las mutantes que después de tres días comienzan a lisiarse en el centro de la colonia para finalmente autolisiarse totalmente después de cinco días. El tercer grupo se compone de mutantes que forman conidióforos en el centro de la colonia dos o tres días después de la inoculación, mientras que el margen

permanece *fluffy*. En estas mutantes la conidiación se retrasa al menos un día con respecto a una cepa silvestre.

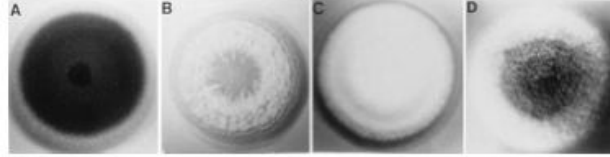


Figura 4. Clases fenotípicas de las mutantes *fluffy*. Las fotografías se tomaron a los 3 días de crecimiento en medio sólido. (A), silvestre; (B), mutante *fluG*; (C), mutante *flbA*; (D), mutantes que después de dos o tres días esporulan, pero la periferia permanece *fluffy*, mutantes en los genes *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. Tomado de Adams *et al.*, 1998.

Los genes cuya mutación provocan este fenotipo se requieren para la activación de *brlA*, es decir, para realizar el cambio del crecimiento micelial hacia el desarrollo del conidióforo. Algunas de estas mutantes “*fluffies*” han identificado las vías de transducción de señales necesarias para la esporulación. Hasta el momento se han clonado 7 genes “*fluffy*”: *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*, *fluG* y *fadA*. Las mutantes afectadas en los genes *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*, y *fluG* esporulan bien en privación de carbono. Sin embargo, son incapaces de esporular en respuesta a la privación de nitrógeno. Por el contrario, ciertas mutantes dominantes *fadA* y las mutantes nulas en *flbA* no esporulan en privación de carbono, ni de nitrógeno (Sánchez *et al.*, sin publicar; Tapia, 1996).

1.6.1. El gen *fadA* codifica para una proteína $G\alpha$ que en su forma activa inhibe la esporulación y promueve el crecimiento

La vía de *FadA* inhibe la conidiación y estimula el crecimiento (Fig 5). Las mutantes en *fadA* son dominantes, jamás esporulan y se empiezan a autolisar después de tres días de crecimiento. De ahí el nombre del gen, *fadA*, de *fluffy autolytic dominant* (Yu *et al.*, 1996). Las mutantes en *fadA* se aislaron al mutagenizar un diploide y haploidizarlo con benomil.

El gen *fadA* se encuentra en el cromosoma VIII. La secuencia del gen codifica para un polipéptido de 353 aminoácidos que se parece a la subunidad α de una proteína G. Tiene 90% de identidad comparada con la proteína Gna2 de *Neurospora crassa* y con la proteína CPG1 de *Cryphonectria parasitica* (Turner y Borkovich, 1993; Choi *et al.*, 1995). Estas tres proteínas tienen 55% de identidad con la subunidad alfa de las proteínas G triméricas inhibitorias de los mamíferos. Además, estas proteínas comparten rasgos que son diagnósticos de la familia $G_i\alpha$ que incluye la presencia de una cisteína localizada cuatro aminoácidos antes del C-terminal. Este motivo es parte de la secuencia consenso del sitio de activación de la toxina de *Bordetella pertussis* (West *et al.*, 1985). Las tres proteínas tienen también en el amino terminal la secuencia consenso para la miristoilación (MGXXXS) (Buss *et al.*, 1987).

Al comparar el alelo *fadA* de la cepa mutante autolítica h1FAD4 con el alelo silvestre muestra un cambio de la glicina 42 por una arginina (*fadA*^{G42R}) (Yu *et al.*, 1996). Esta glicina es importante para la actividad de GTPasa. De esta forma, esta mutación provoca la pérdida intrínseca de la actividad de GTPasa con lo cual el GTP queda unido permanentemente a la proteína G (Simon *et al.*, 1991; Kurjan, 1992). Esto probablemente se logra porque durante el crecimiento un factor desconocido interactúa con un receptor para activar a FadA (Fig. 5). A diferencia, cuando la hifa madura la proteína FluG que estimula la conidiación, activa a FlbA que es una proteína que ayuda a la actividad GTPasa de FadA. Por lo tanto, FlbA inhibe la actividad de FadA (Lee y Adams, 1994). La activación del desarrollo requiere que FadA se inactive. Por analogía con otras proteínas $G\alpha$, para que ésta se active se requiere de otras proteínas reguladoras del señalamiento de proteínas G, que se llaman RGSs, como lo es la proteína FlbA de *A. nidulans*. Por lo tanto, el papel principal de FlbA es inactivar a FadA-GTP, ayudando a que ocurra el intercambio de GTP a GDP, esto induce la esporulación. Para que nuevamente se active la proteína G, se debe realizar nuevamente un intercambio de GDP a GTP. Esto probablemente involucra que un ligando se una a un receptor de proteínas G (Neer, 1995). Esto activa el

crecimiento y bloquea la esporulación. La sobre-expresión del gen *flbA* en una cepa $FadA^{G42R}$ no activa la esporulación. En contraste, la interrupción de *fadA* provoca un crecimiento reducido y conidiación, incluso en condiciones ambientales que bloquean la esporulación en la silvestre. De esta forma, la activación de la vía de FadA permite la proliferación y bloquea la esporulación de la misma manera que la pérdida de función de *flbA*. En una mutante doble $\Delta fadA$, $\Delta flbA$ ocurre esporulación. Esto apoya la hipótesis que la principal función de FlbA es inactivar a FadA.

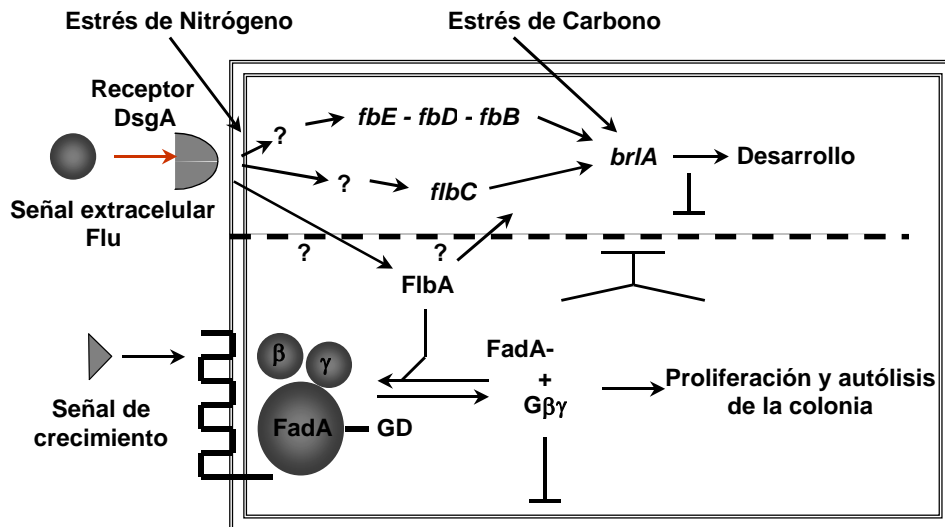


Figura 5. Modelo que describe la interacción entre los genes *fluffy*. Una vía involucra a una proteína $G\alpha$ que con GTP unido regula algunos efectores que estimulan la proliferación y reprimen la esporulación. En la otra vía se encuentra *fluG* que produce una señal extracelular para activar la esporulación donde se requieren los genes *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. La señal que produce FluG causa inactivación de FadA por FlbA que funciona como GTPasa. Esto apaga la vía dependiente de FadA y permite la esporulación. Tomado de Adams *et al.*, 1998.

Sin embargo, FlbA tiene otras funciones porque su sobre-expresión causa esporulación aún en mutantes nulas de *fadA* (Lee y Adams, 1995). El efecto de la interrupción de *flbA* se suprime por una *fadA* dominante, $fadA^{G42R}$, o por la

interrupción de *fadA*. Esto apoya la hipótesis de que la primera función de FlbA en el desarrollo se regula negativamente por FadA. La pérdida de función de *fadA* o *fadA*^{G42R} dominante suprimen el requerimiento de *flbA*, pero no de *fluG* en la conidiación. Esto se conoce porque en una cepa Δ *fluG* y con una mutación que impida la disociación de la proteína G, *fadA*^{G203R}, o en una mutante doble Δ *fluG*; Δ *fadA* no hay esporulación y hay crecimiento restringido, es decir, se requiere *fluG*. Esto indica que FluG tiene un papel independiente de FadA en la conidiación. Por lo tanto, en el crecimiento de la colonia algunos factores desconocidos interactúan con un receptor para activar a FadA. Cuando las hifas maduran hay diferentes factores que controlan la esporulación y bloquean la proliferación. Este posible factor es FluG que activa a FlbA para que inactive a FadA.

La expresión del gen *fadA*, al igual que la expresión de los genes *flbA* y *fluG*, permanece constante a lo largo de todo el ciclo de vida (Lee y Adams, 1995). Esto indica que su regulación ocurre a un nivel diferente que su expresión.

Además de *fadA*^{G42R}, se han aislado otras mutantes con un fenotipo similar. Estas mutantes tienen un cambio de la arginina 178 por una cisteína o por una leucina, o la glutamina 204 por una leucina. También se han aislado mutantes que tienen un cambio de la glicina 183 por una serina. Todas estas mutantes también predicen una proteína G constitutivamente activa (Wieser *et al.*, 1997). La arginina 178 tiene un papel importante en la actividad de GTPasa y forma una asociación crítica con el fosfato GTP γ (Coleman *et al.*, 1994). Particularmente, en esta mutante el fenotipo puede disminuirse al crecerla en un medio con 0.8 M de NaCl u otro medio con alta osmolaridad. Este fenotipo se parece a una cepa *flbA*⁻. Otras mutantes *fadA* solo se rescatan débilmente en estas condiciones. La glicina 183, por su parte, es parte del dominio switch I. Estos dominios sufren cambios conformacionales después de la unión del ligando al receptor que activa a una proteína G α (Lambright *et al.*, 1994).

Por otra parte, la secuencia consenso DXXG (G203) es importante para la disociación de la subunidad $G\alpha$ de las subunidades $G\beta\gamma$ (Rens-Domiano y Hamm, 1995). En este sitio se realizó una mutación dominante de *fadA* cambiando la glicina 203 por arginina, lo cual impide la disociación de la subunidad $G\alpha$ de las subunidades $G\beta\gamma$ (Yu *et al.*, 1996). Esta mutación se llama *fadA*^{G203R}. Otra mutación similar que causa una proteína *fadA* inactiva es *fadA*^{R205H} (Yu *et al.*, 1999). El crecimiento de ambas mutantes es mucho más reducido que las cepas que tienen el gen *fadA* interrumpido y la esporulación ocurre más rápidamente que en una cepa silvestre. Asimismo, ocurre esporulación en condiciones donde normalmente no ocurre como es en cultivo sumergido. Al analizar una mutante doble *flbA*⁻, *fadA*^{G203R}, se observa esporulación en cultivo sumergido, es decir, *fadA*^{G203R} sobrepasa la necesidad de *flbA*. De igual manera, la sobre-expresión de *flbA* en una cepa que carece de *fadA* o que tiene a *fadA*^{G203R} causa esporulación en cultivo sumergido (Lee y Adams, 1994). Contrariamente, la mutante dominante *fadA*^{R205H} no esporula en medio líquido (Yu *et al.*, 1999). Al sobre-expresar *flbA*, en una cepa *fadA*^{G42R} no hay esporulación en medio líquido. Por lo tanto, FlbA probablemente tiene otras funciones además de inhibir la actividad de FadA. Esta función de FlbA, independiente de $G\alpha$, contrasta totalmente con SSt2 que es completamente dependiente de la $G\alpha$ (Dohlman *et al.*, 1995). Es probable que la actividad independiente de FadA, de FlbA involucre interacciones con las subunidades $G\beta\gamma$. Así como *fadA*^{G203R} interfiere con las subunidades $G\beta\gamma$ y con la subunidad $G\alpha$, FlbA podría inactivar el señalamiento en las tres subunidades.

1.6.2. El gen *flbA* antagoniza al señalamiento a través de la proteína FadA

Las mutantes en el gen *flbA* forman colonias que producen hifas que se entrecruzan y que se autolisan cuando la colonia madura (Figura 4 B) (Lee y

Adams, 1994). Por lo tanto, estas mutantes son muy similares a las mutantes *fadA*^{G42R}. La lisis comienza aproximadamente a los tres días después de la inoculación, de tal manera que a los cinco días después de la inoculación, la colonia se ha autolisiado totalmente. Este fenotipo probablemente se debe a la estrecha asociación de las hifas, lo cual puede causar estrés fisiológico. A diferencia de otros genes, cuya mutación producen un fenotipo *fluffy*, el gen *flbA* se requiere tanto para el crecimiento, como para el desarrollo. El fenotipo se remedia parcialmente al crecer a la mutante en alta osmolaridad (0.8 M de NaCl). Sin embargo, en medio líquido en condiciones de alta osmolaridad no se rescata el fenotipo *fluffy*. Por lo tanto, el hecho de que *flbA* se requiera para la conidiación sólo bajo ciertas circunstancias nuevamente apoya la idea que *brlA* se activa en más de una vía (Adams *et al.*, 1992). El gen *flbA* se requiere para esporular en carencia de nitrógeno y carbono (Lee y Adams, 1995).

El gen *flbA* se encuentra en el cromosoma I (Wieser *et al.*, 1994). El mRNA de este gen es de 3 kpb y, permanece relativamente constante durante todo el ciclo de vida, pero hay un menor incremento en el desarrollo. La sobre-expresión de *flbA* en cultivo sumergido provoca el desarrollo de conidióforos reducidos.

El análisis de la secuencia muestra que este gen codifica para un polipéptido de 717 aminoácidos. La secuencia de este polipéptido predice que forma parte de una familia de proteínas, las cuales conservan un dominio carboxilo terminal de 120 aminoácidos que regula negativamente a las proteínas G (Yu *et al.*, 1996). A estas proteínas se les llama RGS (proteínas reguladoras del señalamiento de las proteínas G) (Berman *et al.*, 1996). Las RGS funcionan como GAPs, es decir, como activadoras de GTPasa y de esta forma controlan negativamente el señalamiento intracelular. Particularmente, este gen tiene 30% de identidad a la proteína SST2 de *S. cerevisiae* (Dietzel y Kurjan, 1987). En el caso de este organismo esta proteína se requiere para terminar el crecimiento y desensibilizar la respuesta a la feromona del apareamiento después de la

exposición prolongada a ésta. Las células desensibilizadas desacoplan la unión de la feromona a la activación de la cascada de señalización de las proteínas G. Esto resulta en el arresto de G1 en el ciclo celular. Las mutantes *sst2⁻* no se recuperan del arresto de G1 y son supersensibles a la feromona del apareamiento que produce el tipo celular opuesto. Por lo tanto, SST2 parece regular negativamente algún componente de la vía de señalización que permite la desensibilización a la feromona del apareamiento. Una mutante *flbA⁻* con el gen *SST2* bajo el promotor inducible *alcA* no rescata el fenotipo *flbA⁻*, lo cual indica que *flbA* tiene diferente función a *SST2*. Además FlbA tiene dos dominios DEP (*dishevelled*, *EG1-10 pleckstrin*) que parece, se relacionan en el transporte de proteínas hacia el Aparato de Golgi o la membrana plasmática (Dolhman *et al.*, 1996).

La sobre-expresión de *flbA* en hifas vegetativas sumergidas provoca la formación de conidióforos reducidos, aunque con cierto retraso en relación a las cepas silvestres. La interacción entre *flbA* y *fluG* es compleja, ya que mutantes dobles de estos genes muestran un fenotipo como una mutante simple *flbA* (Lee y Adams, 1994). Esto indica que *flbA* es epistático a *fluG*. Las mutantes simples de ambos genes responden a la osmolaridad alta produciendo conidióforos. Mutantes dobles en ambos genes no responden a la osmolaridad alta. Además *fluG⁻*, pero no *flbA⁻* conidia en respuesta a condiciones de limitación de nitrógeno. La mutante doble hace pocos conidióforos solamente en condiciones de limitación de nitrógeno y osmolaridad alta. Asimismo una cepa $\Delta flbA$ es capaz de rescatar extracelularmente a una cepa $\Delta fluG$. Esto indica que *flbA* funciona río abajo de $\Delta fluG$. En un intento para clarificar la relación entre estos dos genes se construyó una cepa con la fusión $\Delta flbA; alcA::fluG$ y otra cepa $alcA::flbA; \Delta fluG$ (Lee y Adams, 1995). La sobre-expresión de *fluG* en un fondo genético $\Delta flbA$ no indujo la expresión de *brlA* ni el desarrollo del conidióforo. Esto indica que *fluG* funciona antes de *flbA* y requiere a *flbA* para activar el desarrollo. Sin embargo, la sobre-expresión de *flbA* en una mutante *fluG* tampoco indujo la expresión de *brlA* ni el desarrollo del conidióforo. Esto

indicaría que *flbA* funciona antes de *fluG*. Todos estos datos pueden explicarse si *flbA* tiene un papel en regular algunos aspectos del crecimiento y que otro papel es responder a la señal que produce *fluG*. De esta manera, se sugiere que *flbA* y *fluG* funcionan interdependientemente en activar la acumulación del mRNA de *brlA* e inducir el desarrollo del conidióforo.

Para determinar si la sobre-expresión de *flbA* o *fluG* activa el desarrollo a través de *brlA α brlA β* , se construyeron cepas *alcA(p)::flbA* y *alcA(p)::fluG* que fueran *brlA α ⁺ brlA β* o *brlA α ⁻ brlA β ⁺* (Lee y Adams, 1994). La sobre-expresión de *flbA* o *fluG* en cepas *brlA α ⁻ brlA β ⁺* causa el desarrollo del conidióforo más rápidamente que en una cepa silvestre para el locus *brlA*. Esto es particularmente notable en la fusión *alcA::fluG*, donde el tiempo requerido para la producción del conidióforo en la silvestre es de 18 horas y en una cepa *brlA α ⁻ brlA β ⁺* es de nueve horas. Por contraste, al sobre-expresar *flbA* o *fluG* en cepas *brlA α ⁺ brlA β* no hay desarrollo del conidióforo y las cepas muestran un fenotipo como al sobre-expresar *fluG* o *flbA* en una cepa sin *brlA*. Sin embargo, el mRNA de *brlA α* se detecta seis horas después de inducir la sobre-expresión de *fluG* o *flbA* en una cepa *brlA α ⁺ brlA β* . Esto indica que la falta del desarrollo del conidióforo no es debido a la falta de *brlA*, sino tal vez a la diferencia en actividad entre BrI α y BrI β .

1.6.3. Supresores de *flbA*: *sfaA*, *sfaB*, *sfaC*, *sfaD* y *sfaE*

Para entender más la función de *flbA* en regular el crecimiento y la conidiación se aislaron supresores de *flbA* mutagenizando con NQO una mutante en el gen *flbA*, la mutante *flbA98* (Yu *et al.*, 1999). Esta mutante tiene un defecto en la esporulación menos severo que $\Delta flbA$. Se aislaron cinco mutantes que esporularon casi como una cepa silvestre y se les llamó *sfaA*, *sfaB*, *sfaC*, *sfaD* y *sfaE*. Se les llamó así por ser supresores de *flbA*. *SfaB* es

alelo de *FadA* siempre activa y tiene una mutación *fadA*^{R205H}. Los genes *sfaA*, *sfaC* y *sfaE* no se han aislado, ni se conoce su secuencia. Para conocer si son supresores de *flbA* dominantes o recesivos se realizaron diploides entre cada una de ellas y una cepa *sfa*^{WT}, $\Delta flbA$. Los supresores *sfaC*, *sfaD* y *sfaE* son dominantes a 37°C, *sfaA* es semidominante, ya que aunque esporuló, se observa un poco *fluffy*. Sin embargo a 25°C se observa nuevamente el fenotipo *fluffy*, es decir, son supresores dominantes sensibles al frío. También se analizó si son supresores dominantes con respecto a *fadA* siempre activa. Los supresores *sfaA*, *sfaC* y *sfaD* son recesivos, mientras que *sfaE* es dominante.

En cuanto a la esporulación en cultivo sumergido los supresores *sfaC* y *sfaD* elaboran conidióforos complejos en cultivo sumergido. Todos necesitan a *fluG* para esporular. Aunque no se sabe que es *sfaA* y *sfaC* es interesante especular que podría tratarse de elementos de proteínas G heterotriméricas. Se piensa esto porque la inhibición o pérdida de G β o γ podría causar hiperesporulación. En apoyo a esta hipótesis *sfaC*, así como *sfaD*, causan esporulación hiperactiva en cultivo sumergido.

El gen *sfaD* codifica para un polipéptido de 352 aminoácidos que comparte 60% de identidad con la subunidad β de las proteínas G de mamíferos (Rosén *et al.*, 1999). Este polipéptido incluye siete repeticiones de 40 aminoácidos que terminan con triptofano-ácido aspártico que son característicos de las proteínas G β . El gen *sfaD* es el único gen parecido a la subunidad β que se encuentra en todo el genoma de *A. nidulans*. Por lo tanto, es posible que interactúe con las otras subunidades G α y que participe en varias vías de señalización.

En cultivo sumergido una mutante $\Delta sfaD$ crece sólo 20% en relación a una cepa silvestre. Mientras que una mutante en cultivo sumergido $\Delta fadA$ crece 63% con respecto a una cepa silvestre. Una mutante doble $\Delta fadA \Delta sfaD$ crece casi como $\Delta sfaD$. Los defectos de $\Delta flbA$ se suprimen por $\Delta sfaD$ o $\Delta fadA$. Sin

embargo, $\Delta flbA$ sólo suprime los defectos de $\Delta fadA$, pero no los de $\Delta sfaD$. Estos resultados apoyan la hipótesis de que FadA y SfaD se requieren para el crecimiento normal. De tal forma que SfaD tiene una función directa sobre FadA al activar efectores que regulan el crecimiento de las hifas. Esto apoya la hipótesis de que FadA y SfaD funcionan como parte de la misma proteína G. Asimismo en cultivo sumergido una mutante $\Delta sfaD$ es capaz de formar conidióforos complejos. Esta esporulación también ocurre en mutantes dobles $\Delta sfaD \Delta fadA$ y en mutantes dobles $\Delta sfaD \Delta flbA$. Por lo tanto este comportamiento no es dependiente de *fadA* o *flbA*.

La interrupción de *sfaD* causa un fenotipo casi silvestre en medio sólido, solamente que las hifas crecen menos densas. Sin embargo, las mutantes $\Delta sfaD$ producen más células Hülle y no producen cleistotecios, de una manera similar a la mutante *fadA*^{G203R}. En contraste, *fadA* inactiva, *fadA*^{G203R}, no provoca el incremento de la formación de células Hülle, pero tampoco forma cleistotecios. La mutante doble $\Delta sfaD, \Delta fadA$ tiene un fenotipo intermedio porque produce un incremento en las células Hülle y no produce cleistotecios. A diferencia, las cepas con la proteína G siempre activa no forman células Hülle ni cleistotecios y se autolisian aún con el genotipo $\Delta sfaD$. Por lo tanto, $\Delta sfaD$ no suprime a estas mutantes. Esto indica que FadA puede funcionar independientemente de SfaD. Por lo tanto, aunque FadA controla activamente el crecimiento, el papel de SfaD no es esencial para el crecimiento. De esta forma SfaD y FadA son reguladores positivos del crecimiento con funciones que se sobrelapan y FlbA controla las actividades de ambas proteínas.

1.6.4. El gen *gpgA* codifica para la subunidad γ de *A. nidulans*

Como se encontró que la subunidad α de una proteína G regula el crecimiento y la esporulación en *A. nidulans*, se buscó la subunidad γ de esta proteína. El análisis del genoma de *A. nidulans* identificó un solo gen que

codifica para una probable subunidad γ de una proteína G (Seo *et al.*, 2005). Lo llamaron *gpgA* por subunidad gamma de proteína G. Este gen se encuentra en el cromosoma VI. El polipéptido que se predice consiste de 90 aminoácidos que muestra 72% de similitud con la proteína Ste18p de *S. cerevisiae*. En el extremo amino terminal tiene un dominio *coiled-coil*, característico de las subunidades γ . Este dominio es necesario para la interacción con la subunidad $G\beta$. En el extremo carboxilo terminal tiene la secuencia CTIM que probablemente sufre farnesilación. Esta modificación también es característica de las subunidades γ . Los niveles del mRNA de *gpgA* permanecen constantes a niveles relativamente altos durante todo el ciclo de vida.

La interrupción de *gpgA* resulta en un crecimiento vegetativo restringido en medio líquido, con un decremento en la extensión y ramificación de las hifas (Seo *et al.*, 2004). Sin embargo, en medio sólido en las mutantes *gpgA* no se afecta el crecimiento radial, aunque presentan esporulación asexual menor y retrasada, es decir, presentan un fenotipo *fluffy*. Además no producen cleistotecios en autofertilización y en heterocruzas producen muy pocos. Sin embargo, produce un alto número de células Hülle. En cultivo sumergido, a diferencia de $\Delta sfaD$, $\Delta gpgA$ no esporula al igual que una cepa silvestre, ni siquiera en un fondo genético $\Delta sfaD$.

Una mutante doble $\Delta gpgA \Delta flbA$ suprime el fenotipo *fluffy* de $\Delta flbA$. Por lo tanto, esta es la sexta mutación que suprime a mutantes $\Delta flbA$. El hecho de que la interrupción de *fadA*, *sfaD* o *gpgA* resulten en un crecimiento vegetativo reducido y que todos estos genes supriman a $\Delta flbA$ apoyan la idea de que GpgA funciona en el crecimiento vegetativo mediado por FadA-SfaD. Además sugiere que FadA, SfaD y GpgA constituyen una proteína G funcional que media el crecimiento vegetativo. Asimismo, $\Delta gpgA$ no suprime a $\Delta fluG$. Por lo tanto, FadA-SfaD-GpgA controlan el crecimiento vegetativo en una vía separada e independiente de FluG.

I.6.5. PKA se activa por FadA y estimula el crecimiento

Para tratar de entender más la esporulación de *A. nidulans* se buscó el gen de la adenilato ciclasa. La función de la enzima adenilato ciclasa es sintetizar el mensajero intracelular cAMP. Esta enzima en muchos organismos, se regula por la subunidad α de una proteína G que estimula, en el caso de una $G_s\alpha$, o por una proteína G que inhibe, en el caso de una $G_i\alpha$, la actividad de la adenilato ciclasa (Dohlman *et al.*, 1991). Al activarse la adenilato ciclasa la concentración intracelular de cAMP aumenta. El cAMP activa a la proteína cinasa A (PKA) que se compone de dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias. La unión de las dos subunidades regulatorias provoca la liberación de las subunidades catalíticas y por lo tanto la PKA se activa. En el genoma de *A. nidulans* se encontró el gen *pkaA* que codifica para un marco de lectura de 472 residuos. El extremo amino terminal muestra poca similitud a las PKA, con la excepción de 12 aminoácidos que son similares en las PKA de los hongos, con los cuales tiene entre el 52 al 70% de identidad con otras PKA de hongos. Esta PKA del aminoácido 168 al 173 presenta una secuencia consenso GXGXXG que es el sitio de unión para ATP, seguida por ocho residuos de lisina que están presentes muchos organismos (Hunter y Cooper, 1985).

El gen *pkaA* se expresa constitutivamente. En medio sólido, al sobre-expresarlo hay más formación de hifas aéreas y menor número de conidios produciendo un fenotipo *fluffy* (Shimizu y Keller, 2001). Sin embargo, el fenotipo no es tan severo como en las mutantes $\Delta flbA$ o $fadA^{G42R}$. Por el contrario, una mutante $\Delta pkaA$ tiene un crecimiento radial reducido y produce mas conidios por área, semejando al fenotipo de la mutante $fadA^{G203R}$. Sin embargo, en cultivo sumergido no hay esporulación en las cepas que sobre-expresan a *pkaA*, en lo cual no se parecen a $fadA^{G203R}$. Esto y el hecho de que en medio sólido la cepa $\Delta pkaA$ muestre un crecimiento reducido y mayor esporulación demuestran que PKA inhibe el desarrollo asexual. Las mutantes dobles $\Delta pkaA$; $\Delta flbA$ y $\Delta pkaA$;

fadA^{G42R} muestran un crecimiento radial muy reducido, un fenotipo intermedio en el número de esporas entre cepas Δ *pkaA* y cepas *fadA*^{G42R} o cepas Δ *flbA*, es decir, restauran parcialmente la conidiación y no se autolisian. Esto sugiere que la inhibición de FadA del desarrollo asexual se media a través de esta PKA y por lo tanto forma parte de la vía de FadA-FlbA, es decir, FadA activa a PKA. Sin embargo, el hecho de que la restauración sea parcial también apoyan la idea de que FadA actúa inhibiendo la conidiación también de manera independientemente de PKA.

I.6.6. El gen *fluG* participa en la producción de un factor extracelular que regula la conidiación

El gen *fluG*, inicialmente identificado como *acoD* (Yager *et al.*, 1982), se aisló por complementación y se encuentra en el cromosoma III. Las mutantes *fluG* se aislaron como cepas sensibles a temperatura. A temperatura permisiva conidian como una cepa silvestre y a temperatura restrictiva son *fluffy* (Yager *et al.*, 1982). El polipéptido FluG tiene 864 residuos y una masa molecular de 96 kDa. El análisis de *fluG* indica que el carboxilo terminal se parece a la glutamina sintetasa I (GSI) de procariotes (Wieser *et al.*, 1994). El parecido más significativo es con la GSI de la eubacteria *Bacillus cereus* y la de la arqueobacteria *Methanococcus voltae*. Este es el primer gen eucariote que se parece más a GSI que a la glutamina sintetasa II (GSII), que es típica de los eucariotes. La comparación de las secuencias entre GSI y GSII sugieren que estos dos polipéptidos se formaron por duplicación antes de la divergencia entre los procariotes y los eucariotes (Kumada *et al.*, 1993). En los sitios catalíticos también se parece a la glutamina sintetasa de eucariotes. Sin embargo, FluG tiene una actividad que es diferente a la síntesis de glutamina, ya que una glutamina sintetasa I procariota es incapaz de sustituir a FluG. Además las mutantes *fluG* no son auxótrofas de glutamina y la adición de glutamina al medio no suprime el fenotipo *fluffy*. Otra evidencia de que *fluG* no tiene actividad de

glutamina sintetasa es que el *locus glnA* codifica para una glutamina sintetasa típica de eucariotes (Cornwell y MacDonald 1984). Una doble mutante *fluG*, *glnA* muestra el mismo requerimiento de glutamina que una mutante sencilla *glnA*.

La parte amino terminal de FluG se parece a la nodulina 6 de plantas como *Medicago truncatula*, la cual se induce durante la infección de la raíz con *Sinorhizobium meliloti* (Mathis *et al.*, 1999). Sin embargo, la parte carboxilo terminal, que corresponde del residuo 387 al 865 y produce un polipéptido de 58 kDa, por sí sola es suficiente para inducir la esporulación en un cultivo sumergido y para complementar una cepa $\Delta fluG$ (D'Souza *et al* 2001). FluG está presente tanto en las células en crecimiento, como después de la inducción de la conidiación.

Las mutantes en $\Delta fluG$ se distinguen de otras mutantes *fluffy* en tres aspectos (Wieser *et al.*, 1994). Primero, son totalmente aconidiales en medio completo, pero conidian un poco en medio mínimo. Segundo, se pueden inducir a conidiar cuando crecen cerca de otra mutante *fluffy* o de una cepa silvestre. Tercero, acumulan un metabolito en el medio que es de color anaranjado (Fig 4 C).

La tasa de crecimiento de las mutantes $\Delta fluG$ (*acoD*) se reduce al menos dos veces en medio mínimo con respecto a la tasa de crecimiento en medio completo (Adams *et al.*, 1992). En medio completo, en una cepa silvestre, se detecta el mRNA de *brlA* entre las cuatro y seis horas después de la inducción del desarrollo que corresponde al tiempo cuando las vesículas de los conidióforos se están formando. Por el contrario, en una cepa con la interrupción de *fluG*, en este mismo medio no se observa mRNA de *brlA* ni vesículas de conidióforos. En medio mínimo, en una cepa silvestre se observa mRNA de *brlA* entre tres y seis horas después de la inducción del desarrollo. En este mismo medio en una mutante *fluG*, *brlA* se observa entre 6 y 9 horas después de la inducción del desarrollo. Los conidióforos se ven después de 4

horas de inducción en una silvestre y a las 24 horas en una cepa mutante. El mRNA de *fluG* está presente después de la germinación y persiste en todo el ciclo de vida asexual a niveles relativamente constantes, pero no se encuentra en esporas maduras. Esto sugiere que su regulación es postranscripcional. El gen *fluG* fue el primer gen relacionado con la conidiación, cuya regulación no se controla principalmente a nivel de la transcripción. Además FluG se requiere para la represión del mismo *fluG*. Por lo tanto FluG regula negativamente su propia expresión. Además FluG se localiza en el citoplasma (Lee y Adams, 1995).

Como se mencionó anteriormente, *fluG* no es totalmente esencial para la conidiación. Se puede prescindir de él parcialmente al crecer a una colonia bajo estrés osmótico o en condiciones de limitación de nutrientes (Adams *et al.*, 1992). Sin embargo, el desarrollo que se observa en estas condiciones se retrasa al menos 24 horas comparado con una cepa silvestre. En medio líquido la alta osmolaridad no rescata el fenotipo *fluffy* (Lee y Adams 1995). El gen *fluG* se requiere para esporular en respuesta a la privación de nitrógeno, pero no de carbono. En este caso se aumenta la expresión de *brlA β* , pero no la de *brlA α* . El fenotipo *fluG* también se suprime cuando una mutante *fluG* se crece junto a una colonia silvestre, aún si entre ellas hay una membrana de diálisis con un poro de 6 a 8 kDa. Esto sugiere que *fluG* produce una señal de conidiación extracelular. Esta señal probablemente abre la vía de señalización necesaria para la esporulación. Sin embargo, no se ha logrado rescatar o complementar el fenotipo silvestre en una mutante Δ *fluG* al añadir extractos de cultivos silvestres. Esto puede deberse a la baja abundancia o inestabilidad de la molécula o a la presencia de antagonistas. Es probable que FluG actúe directamente en hacer una señal de esporulación o puede actuar como un regulador que controla la señal de esporulación. Otras mutantes *fluffy*, como mutantes Δ *flbA* muestran niveles normales de expresión de *fluG* y pueden complementar el fenotipo silvestre en mutantes Δ *fluG*. Las mutantes en *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* también complementan extracelularmente a una mutante Δ *fluG*. Por lo tanto, estos

genes funcionan río abajo de *fluG* o sus productos se requieren para responder a la señal FluG.

La sobre-expresión de *fluG* permite la formación de vesículas y esterigmatas 18 horas después de la inducción y conidióforos complejos muy similares a los silvestres a las 24 horas (Lee y Adams, 1995). La complejidad morfológica de estos conidióforos contrasta con la de los conidióforos reducidos que se forman por la sobre-expresión de *flbA* o *brlA*. Esto sugiere que *brlA* se activa en más de una vía y que *fluG* actúa muy temprano en la señalización.

Como se mencionó anteriormente VeA se requiere para esporular en presencia de la luz. Curiosamente se han identificado seis supresores extragénicos de *veA1* que son alelos de *fluG*. Una clase de estos supresores se define por una mutación que no conidia en luz roja en un fondo genético *veA+* que normalmente responde a la luz roja. La otra clase incluye mutaciones que restauran la conidiación dependiente de la luz en una mutante *veA1* que normalmente conidia sin dependencia de la luz roja. A estos supresores se les ha llamado *fluG701*, *fluG20^{sveA1}* y *fluG30^{sveA1}* (Yager et al., 1998). Esto sugiere la posibilidad que *fluG* codifica para un fotorreceptor de luz roja. Al menos indica que la actividad de *fluG* se influye o se afecta por funciones dependientes de la luz. Un modelo simple para explicar la interacción entre *fluG* y *veA1* es que *veA1* funciona como un integrador de la señal de la luz. De esta forma *veA1* modula la expresión de *fluG*, regulando también la señal extracelular. Alternativamente, *veA1* es un regulador negativo de la expresión de genes específicos de la conidiación (Mooney y Yager, 1990). De tal manera que la expresión de *fluG* puede ser desreprimida en cepas *veA1*. Otra posibilidad es que se requiere una interacción entre FluG y VeA para la función de *fluG*. Si VeA tiene efecto sobre la expresión de *fluG* estos efectos son post-transcripcionales, ya que el mRNA de *fluG* no se afecta si están presentes o ausentes el gen *veA* o la luz. De esta forma en una mutante *fluG⁺;veA1⁺* no se produce este factor extracelular en ausencia de la luz, a pesar de la expresión

constitutiva de *fluG*. Esto sugiere que las condiciones ambientales pueden influir la producción del factor. Por lo tanto la incapacidad de las cepas *veA+* para producir el factor en la obscuridad indica que la actividad de *veA* dependiente de la luz precede o se requiere para la síntesis del factor extracelular.

I.6.7. Supresores de $\Delta fluG$. El supresor *dsgA*

Se han aislado supresores de $\Delta fluG$, como *dsgA1* que es un supresor dominante (D'Souza *et al.*, 2001). Este gen se le mapeó en el cromosoma VI, pero no se conoce su secuencia, ni se ha aislado. Una cepa $\Delta fluG$, *dsgA1* muestra un fenotipo hiperconidial en medio líquido y sólido. Este fenotipo aumenta en una cepa *fluG⁺dsgA1* que, a diferencia de una cepa $\Delta fluG$ *dsgA1*, esporula en medio mínimo líquido con extracto de levadura. Una mutante doble $\Delta fluG$; *dsgA* también muestra un crecimiento radial reducido y no produce cleistotecios en condiciones que favorecen el ciclo sexual en una cepa silvestre. Este fenotipo puede suprimirse con 2% de glucosa como fuente de carbono y 20 mM de glicina como fuente de nitrógeno. El supresor *dsgA1* también suprime la pérdida de conidiación de una mutante *fadA* dominante y de una mutante *flbA* nula (D'Souza *et al.*, 2001). Por lo tanto DsgA funciona como parte de la vía del señalamiento de FadA antes que tener un papel directo en la esporulación. A diferencia, otras mutaciones que inactivan el señalamiento de FadA, tales como $\Delta fadA$ (Yu *et al.*, 1996) y *sfaD* (Rosen *et al.*, 1999) que suprimen a $\Delta flbA$, son incapaces de suprimir a $\Delta fluG$. Por lo tanto, se propone que DsgA funciona directamente en activar la esporulación y que la mutación en *dsgA1* estimula la vía de activación de la esporulación. Un posible mecanismo de supresión de *fluG* por *dsgA1* puede ser la activación constitutiva de la conidiación vía componentes río abajo de FluG. Este componente podría ser un receptor de un factor extracelular o un componente de transducción de señales de la vía

específica de FadA. Alternativamente, *dsgA* podría identificar un componente de una tercera vía de señalización de conidiación independientes de FluG.

I.6.8. El gen *sfgA* suprime el fenotipo de las mutantes *fluG*. FluG elimina la represión de SfgA y con ello estimula la conidiación

El gen *sfgA* se encuentra en el cromosoma II y codifica para la proteína SfgA de 601 residuos. La proteína SfgA se parece a los factores de transcripción que poseen en el amino terminal el dominio Zn(II)₂Cys₆. Este tipo de dominio está presente en Gal4 de *S. cerevisiae* y AlcR en *A. nidulans* (Seo *et al.*, 2006). Estos factores de transcripción por tener dos núcleos de Zn unidos con seis cisteínas, pertenecen a la familia de las proteínas binucleadas de Zn o factores C6. Su función es activar los genes de algunas vías metabólicas específicas, por lo que se llaman factores de transcripción específicos de vías. SfgA tiene en el amino terminal las señales para una localización nuclear. Diferentes mutaciones de SfgA, inclusive las mutaciones pequeñas que sólo truncan 14 aminoácidos del carboxilo terminal, restauran la conidiación en una cepa $\Delta fluG$. Esto indica que se requiere toda la proteína SfgA para suprimir el fenotipo de las mutantes $\Delta fluG$. Mutaciones que afectan el dominio C6 de la SfgA provocan una mayor conidiación y producen conidiación en medio líquido. Asimismo, la interrupción de *sfgA* elimina el requerimiento de FluG y causa esporulación. Las mutantes dobles $\Delta sfgA; fluG^+$ y $\Delta sfgA; \Delta fluG$ forman conidióforos complejos y el mismo grado de esporulación en medio líquido. Por lo tanto, el papel principal de FluG es quitar la represión que ejerce SfgA. Por el contrario, la sobre-expresión de *sfgA* inhibe la conidiación. De esta forma, durante el crecimiento vegetativo, el nivel del factor FluG es bajo y hay represión de la conidiación a través de SfgA. Una vez que el nivel de FluG alcanza un umbral, FluG remueve a SfgA. Las mutantes dobles entre *flbB*, *flbC* o *flbD* y *sfgA* son algodonosas. Por lo tanto, *sfgA* funciona río abajo de *fluG*, pero río arriba de *flbD*, *flbB*, *flbC* y *briA*. Sin embargo, en la mutante doble *flbE; sfgA*, se suprime el fenotipo *fluffy*.

Esto indica que *flbE* y *sfgA* funcionan al mismo nivel o *sfgA* funciona río abajo de *flbE*.

I.6.9. Los genes *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* codifican para factores transcripcionales que regulan la conidiación

Otros genes, cuya mutación produce fenotipo *fluffy* son *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. Estas mutantes se caracterizan porque después de 2 a 3 días de inoculación se producen conidióforos en el centro de la colonia (Figura 4 D). En estas mutantes el crecimiento radial es similar al de las cepas silvestre. Sin embargo, los márgenes de la colonia permanecen *fluffy* (Wieser *et al.*, 1994). Todos estos genes se aislaron por complementación (Wieser y Adams, 1995; Wieser *et al.*, no publicado). Se expresan en las células vegetativas y su expresión continúa constante durante el desarrollo.

El gen *flbB*, llamado previamente *vegA* (Aguirre *et al.*, 1993) está mapeado en el cromosoma IV y codifica para un polipéptido de 389 residuos con similitud a las proteínas de unión al DNA b-zip. El gen *flbC* se encuentra en el cromosoma VII y codifica para un polipéptido de 354 residuos que incluye dos dominios de CC/HH dedos de zinc como BrlA (Fondon y Adams, datos no publicado).

El gen *flbD* está en el cromosoma VIII. Este gen codifica para un polipéptido de 314 residuos. En los primeros 108 tiene más de 40% de identidad a un factor de transcripción que incluye proto-oncogenes humanos tipo *c-myb* (Wieser y Adams, 1994). En estos proto-oncogenes humanos hay dos o tres repetidos imperfectos de 51 o 52 aminoácidos que poseen tres triptofanos críticos esparcidos cada 18 o 19 residuos. En FlbD hay dos repetidos, pero cada uno tiene sólo dos triptofanos porque en el primer repetido en vez del tercer triptofano hay una tirosina y en el segundo repetido en vez del primer triptofano

hay una isoleucina. Estas substituciones también existen en otras proteínas semejantes a c-Myb (Paz-Ares *et al.*, 1987; Tice-Baldwin *et al.*, 1989). FlbD también tiene otros residuos importantes en la unión al DNA, como por ejemplo, una cisteína en el primer repetido que tiene un papel en la regulación redox de Myb. El mRNA de *flbD* está presente en el crecimiento vegetativo y a lo largo de todo el ciclo asexual. Las mutantes en *flbD* expresan menos del 5% y 20 horas más tarde a *brlA* en relación a una cepa silvestre. FlbD probablemente controla la activación de genes específicos de estado, ya que *flbD* probablemente regula directamente la transcripción de otros genes (Wieser y Adams, 1995). La sobre-expresión de *flbD* causa formación de conidióforos complejos con esporas viables en cultivo sumergido (Wieser y Adams, 1995). En estos cultivos a las 9 horas se observan conidióforos simples y a las 18 horas se observan conidióforos complejos. Este comportamiento requiere de los genes *brlA*, *flbB* y *flbA*. Asimismo, requiere parcialmente de *fluG*, porque los conidióforos que se forman en una cepa carente de *fluG* son menores y se forman más lentamente que en una cepa silvestre. Este comportamiento podría explicarse si la actividad de FluG contribuye a la activación de *flbD*, pero no se requiere absolutamente. De tal forma que la señal de *fluG* se puede requerir para modular la actividad de otros genes que trabajan con *flbD* para activar el desarrollo. Por otro lado, al sobre-expresar a *flbD* no se requiere de *flbC* y *flbE*. Sin embargo, al sobre-expresar a *flbD* en una cepa *flbC*⁻ los conidióforos no son tan numerosos ni tan complejos como en una cepa silvestre. Asimismo, mutantes dobles en *flbC* y *flbD* tienen un efecto aditivo en la falta de esporulación. Por lo tanto, los genes *flbC* y *flbD*, aparentemente, contribuyen independientemente a la activación del desarrollo (Wieser y Adams, 1995). De manera semejante, al sobre-expresar *flbD* en una cepa *flbE*⁻, los conidióforos son más simples que una cepa silvestre.

Análisis de las mutantes dobles entre los genes *flbB*, *flbD* y *flbE* indican que existe una regulación temporal entre estos genes (Wieser *et al.*, 1994). De esta forma, estos genes actúan en una misma vía en el orden *flbE*, *flbD* y *flbB*, pero se encuentran en una vía separada de *flbC*. Al sobre-expresar *fluG* en una mutante *flbB*, a diferencia de en mutantes *flbD* y *flbE*, causa inhibición del

crecimiento y mucha vacuolización de las hifas. En el caso de *flbA*, la relación es complicada, por un lado *flbA* es epistático para *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, lo cual indica que *flbA* funciona antes de estos genes. Sin embargo *flbA* se requiere para el desarrollo del conidióforo que se induce por la sobre-expresión de *flbD*. Por lo tanto, esto puede explicarse como que *flbA* está antes que *flbD* en la vía de señalización. Alternativamente, la actividad de *flbD* se requiere para activar a *flbA*. Una interpretación de estos datos es que *flbD* funciona río arriba de *flbA* para regular la iniciación del desarrollo del conidióforo. De esta forma, mientras que la sobre-expresión de *flbD* causa acumulación del mRNA de *brlA* después de tres horas de inducción, la sobre-expresión de *flbA* causa acumulación de *brlA* entre 6 y 9 horas postinducción del desarrollo.

En el caso de *flbE* se encuentra en el cromosoma I y no hay similitud con otras proteínas en los bancos de datos. La sobre-expresión de *flbE* en cultivos sumergidos causa la activación de *brlA* y esporulación (Wieser *et al.*, 1994). Al igual que *flbB* y *flbC*, *flbE* probablemente codifica para activadores primarios de genes específicos de spora. Las mutantes dobles de cada uno de estos genes con $\Delta fluG$ son fenotípicamente como *fluG*. Esto indica que *fluG* es epistático a *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. Para examinar más esto, se construyeron cepas con la fusión *alcA(p)::fluG* con cada una de estas mutantes. En un medio inducible no se acumula el mRNA de *brlA* ni se logra esporulación. Esto indica que todos estos genes se requieren para la conidiación inducida por *fluG*. Por lo tanto, estos genes funcionan después de *fluG*. En el caso de *flbA* se propone que *flbA* funciona antes que *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* principalmente porque mutaciones en estos genes causan una conidiación retrasada. A diferencia, mutantes *flbA* son completamente aconidiales. Además se construyeron mutantes dobles *flbA*⁻ con *flbB*⁻, *flbC*⁻, *flbD*⁻ o *flbE*⁻, que presentaron un fenotipo autolítico como el de *flbA* sencillo. Esto indica que *flbA* es epistático con cada uno de estos genes. Sin embargo, al sobre-expresar *flbA* en mutantes en *flbC*⁻, *flbD*⁻ y *flbE*⁻ se observa acumulación de mRNA de *brlA* y desarrollo del conidióforo. Esto indica que *flbC*, *flbD* y *flbE* no se requieren para la esporulación inducida por *flbA*. En contraste,

no se observa acumulación de mRNA de *brlA* ni desarrollo del conidióforo al sobre-expresar *flbA* en mutantes *flbB*⁻ y *fluG*⁻. Por lo tanto, los genes *flbB* y *fluG* se requieren para la esporulación inducida por *flbA*. Combinaciones entre mutantes *flbB*⁻, *flbD*⁻ y *flbE*⁻ tienen el mismo fenotipo de conidiación retrasada que mutaciones sencillas. Esto indica que funcionan en la misma vía. Sin embargo, mutantes dobles entre *flbC*⁻ con *flbB*⁻, *flbD*⁻ o *flbE*⁻ tienen una conidiación un día más retrasada que las mutantes simples (Wieser *et al.*, 1994). Mutantes dobles *fluG*⁻ *flbB*⁻, *fluG*⁻ *flbD*⁻ y *fluG*⁻ *flbE*⁻ tienen las características de *fluG*⁻, es decir, son muy *fluffy* y no conidian en el centro. Sin embargo, no forman el pigmento anaranjado característico de *fluG*⁻. Esto indican que *flbB*, *flbD* y *flbE* tienen funciones dependientes e independientes de *fluG*. A diferencia, la mutante doble *fluG*⁻, *flbC*⁻ se parece fenotípicamente a *fluG*⁻ en todos los aspectos. Esto indica que *fluG* es epistático a *flbC*, y por lo tanto, ambos funcionan de manera lineal en la misma vía, actuando primero *fluG*. En contraste, mutantes dobles combinadas entre *flbB*⁻, *flbD*⁻ y *flbE*⁻ no son diferentes fenotípicamente de cepas con mutaciones sencillas en cada uno de estos genes. Esto indica que funcionan en la misma vía. Para todas las mutantes dobles el crecimiento radial es más lento, aunque no disminuye dada la gran cantidad de hifas aéreas (Wieser *et al.*, 1994).

1.6.10. Supresores de *flbD*: *sfdA* y *sfdB*

Los supresores *sfdA* y *sfdB* de *flbD* definen dos nuevos *loci* (Kellner y Adams, 2002). Hasta el momento no se han aislado los genes que los definen. El supresor *sfdA* se encuentra en el cromosoma VI y suprime a Δ *flbD* más débilmente que el supresor *sfdB*. El supresor *sfdB* se encuentra en el cromosoma II. Además de suprimir los defectos en el desarrollo de *flbD*, suprimen a las mutantes *fluG*, *flbB*, *flbC* y *flbE*. Ambos supresores también suprimen parcialmente a mutantes *flbA*. Las cepas con los alelos *sfd* mutados, *sfd*^s, son recesivas en diploides. Estas cepas presentan un crecimiento reducido

y desarrollan conidióforos en cultivos sumergidos. Las mutantes dobles *sfd^S*; *flbD⁺* muestran abundante conidiación, un tamaño muy reducido de la colonia y mucho crecimiento micelial abajo del agar. En contraste a las cepas silvestres que conidian casi exclusivamente en las hifas aéreas.

Se proponen tres modelos para la activación de SfdA y SfdB para la iniciación del conidióforo. En uno, SfdA y SfdB actúan como directos represores de *brlA*, de forma que *fluG* y los genes *flbs* se requieren para antagonizar la actividad de SfdA y SfdB, y activar a *brlA* y permitir la conidiación. En otro, SfdA y SfdB actúan para antagonizar la actividad de *fluG* y los *flbs*. En un tercero SfdA y SfdB actúan en una vía desconocida, independiente de *fluG* y de los genes *flbs*, para reprimir a *brlA*.

I.7. La conidiación y el metabolismo secundario

El metabolismo secundario comúnmente se asocia con la esporulación (Mapleston *et al.*, 1992). La relación entre la esporulación y el metabolismo secundario se basa en que ambos se regulan en una vía de transducción de señales común. Principalmente, se regulan por una proteína G (FadA) y una proteína cinasa A (PKA). Ambas proteínas regulan negativamente la síntesis de aflatoxina, esterigmatocistina y el desarrollo (Hicks *et al.*, 1997; Shimizu y Keller, 2001). Los hongos filamentosos producen una gran variedad de metabolitos secundarios, que incluyen compuestos de interés médico, industrial o agrícola (Calvo *et al.*, 2002). Los metabolitos pueden ser compuestos que activan la esporulación, como los componentes derivados del ácido linoleico (Calvo *et al.*, 2001; Champe *et al.*, 1989). También pueden ser pigmentos, como melaninas que ayudan a la formación de las esporas, o bien, pueden ser productos que se excretan (Calvo *et al.*, 2002). Los metabolitos secundarios pueden ser benéficos como los antibióticos, como la penicilina; o malignos como las micotoxinas. Un tipo de micotoxinas son las aflatoxinas y la esterigmatocistina. La producción de

penicilina, de manera opuesta a la producción de esterigmatocistina, se incrementa en cepas que no esporulan (Tag *et al.*, 2000). Esto se puede deber a que estos metabolitos se regulan de manera contraria (Calvo *et al.*, 2002). La penicilina se favorece en condiciones alcalinas y la esterigmatocistina se favorece en condiciones ácidas. En la primera, los hongos la sintetizan a tiempos más tempranos para protegerse de las bacterias. En la segunda se secreta a tiempos más tardíos para protegerse de otros eucariotes.

A. nidulans no produce aflatoxinas, solamente produce esterigmatocistina, que es el penúltimo precursor en la vía biosintética de las aflatoxinas. Las aflatoxinas son de los productos naturales más tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos que se conocen (Sweeney y Dobson, 1999). Las aflatoxinas y la esterigmatocistina son derivados de un policétido llamado ácido norsolorínico (Brown *et al.*, 1996). La síntesis de los policétidos involucra la condensación de grupos acetilo o manolilo por un complejo enzimático similar a la sintetasa de ácidos grasos. Los genes responsables para la síntesis de las aflatoxinas, así como el de otros metabolitos secundarios se encuentran agrupados (en *clusters*) en los hongos filamentosos (Brown *et al.*, 1996). En el caso de *A. nidulans* este grupo tiene 60 kpb y se compone de cerca de 25 genes que se regulan por el gen *afIR* que codifica para un factor de transcripción (Ehrlich *et al.*, 1999). Las mutantes en *afIR* no expresan los genes para la síntesis de esterigmatocistina, ni producen esterigmatocistina, y tienen menor número de conidios y cleistotecios (Cary *et al.*, 2000). La síntesis de esterigmatocistina se regula por FadA al igual que la esporulación (Hicks *et al.*, 1997). Por lo tanto, en una cepa con FadA constitutivamente activa se reprimen la conidiación y la producción de esterigmatocistina. De esta forma, otras de las mutantes *fluffy* tampoco producen el metabolito secundario esterigmatocistina (Hicks *et al.*, 1997). Tal es el caso de *fluG*, *flbA* y todas las mutantes *fadA* dominantes. Sin embargo, las demás mutantes con esporulación retrasada producen niveles normales de esterigmatocistina. Esto es consistente con un modelo en el cual la esporulación asexual y la producción de esterigmatocistina están coordinadas para inactivar el

crecimiento proliferativo (Yu *et al.*, 1996). Sin embargo, las mutantes *brlA* y las mutante en genes que se expresan posterior a él sí producen esterigmatocistina (Wieser *et al.*, 1997). Esto confirma que la habilidad para esporular esta unida a la habilidad para producir esterigmatocistina, pero a través de la inactivación directa de FadA por *flbA*. De esta forma, la sobre-expresión de *flbA* o mutaciones que inactiven a *fadA* causan en medio líquido expresión precoz de genes que participan en la síntesis de esterigmatocistina y en el desarrollo (Yu *et al.*, 1996). Esta capacidad de *flbA* para activar genes que se involucran en la síntesis de esterigmatocistina y para activar el desarrollo requiere el producto de *fluG*, pero no de *flbB*, *flbC*, *flbD* o *flbE*.

II. JUSTIFICACIÓN

La esporulación es un proceso complejo donde el gen *brlA* desempeña un papel central. Las mutantes algodonosas han permitido identificar funciones importantes en la regulación de la reproducción asexual del hongo *A. nidulans*. De acuerdo a Adams y colaboradores (1994), las mutantes algodonosas se han aislado a saturación. Resultados previos indican que el gen *brlA* se activa o inhibe por dos vías que regulan la esporulación asexual y el crecimiento, en la cuales participan elementos de transducción de señales, factores de transcripción y enzimas (Lee y Adams, 1994 a y b; Wieser y Adams, 1995; Yu *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1998). Esto sugería que para completar estas vías podría haber más genes dentro de ellas; o bien, alternativamente, podría haber otros genes que constituyeran nuevas vías.

Por otra parte, las primeras mutantes algodonosas que se estudiaron se mapearon genéticamente (Dorn, 1970). Estas mutantes no corresponden a las mutantes algodonosas estudiadas por Adams y cols. Esto también sugería que podrían existir otros genes que no se habían identificado, ni caracterizado, cuya mutación provocaría un fenotipo algodonoso. Por lo tanto, para entender el proceso de diferenciación asexual en *Aspergillus nidulans*, se planteó aislar y caracterizar nuevas mutantes algodonosas.

III. OBJETIVO

Aislar y caracterizar genética y fisiológicamente nuevas mutantes con esporulación asexual retrasada

IV. RESULTADOS

Capítulo I. TmpA, un miembro de una nueva familia de probables flavoproteínas de membrana, regula el desarrollo asexual en *Aspergillus nidulans*

Soid-Raggi, G., Sánchez, O y Aguirre, J. TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol* (2006) **59** (3), 854-969.

Resumen

En *Aspergillus nidulans* la reproducción asexual o conidiación se induce por señales ambientales como la exposición al aire o la carencia de nutrientes. Genéticamente depende del gen *brlA*, que codifica para un factor transcripcional tipo dedos de zinc. BrIA directa e indirectamente regula la expresión de un gran número de genes que participan en la formación del conidióforo. Las mutantes algodonosas o mutantes con fenotipo *fluffy* esporulan en menor grado y tardíamente en relación a una cepa silvestre. Estas mutantes han servido para entender de qué manera y qué genes participan en la regulación del gen *brlA*. Anterior a este trabajo sólo se conocían dos vías de regulación del crecimiento y de la conidiación de *A. nidulans*. En una, la subunidad α de una proteína G heterotrimérica, FadA, y su regulador FlbA estimulan el crecimiento e inhiben la conidiación. En la otra, el gen *fluG*, que es el componente que se encuentra más río arriba en la vía de señalización, compuesta por los genes *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, participa en la formación del conidióforo. Por el método REMI nosotros aislamos una mutante que permitió identificar un gen nuevo, el gen *tmpA*, que participa en la conidiación. La proteína TmpA define una nueva familia de

proteínas que probablemente son transmembranales que tienen una función desconocida y que se distribuyen en los hongos y en las plantas. Hay dos grupos de homólogos de TmpA. Un grupo incluye a TmpA y a otras proteínas de 483 a 685 aminoácidos que se encuentran en los hongos y en las plantas. El segundo grupo incluye unas proteínas más grandes de 933 a 1026 aminoácidos, que hasta el momento sólo se han encontrado en los hongos. Este grupo incluye a proteínas con un dominio adicional de adenilación que se parece al que presentan las péptido sintetetasas no ribosomales. En un análisis *in silico* de ambos grupos se observa la presencia de 5 a 6 dominios transmembranales. Además, se observa la presencia de sitios de unión para los cofactores como el NAD(P) y el FAD y posiblemente dominios de unión para grupos hemo. Por lo tanto, TmpA y sus homólogos parecen haber divergido de la familia de las reductasas de hierro.

La interrupción de *tmpA* provoca un fenotipo algodonoso y una expresión baja del gen *brlA*. Este defecto se suprime cuando se crece la mutante $\Delta tmpA$ junto a una cepa con esporulación silvestre o junto a una mutante $\Delta fluG$ sin que haya intercambio genético por contacto entre las hifas. Incluso el fenotipo $\Delta tmpA$ se remedia al hacer crecer a la mutante en un medio en el cual se hizo crecer antes a una cepa silvestre. En medio líquido el gen *tmpA* es esencial para esporular en respuesta a la carencia de nitrógeno, pero no es esencial para esporular en respuesta a la carencia de carbono. El gen *tmpA* se expresa a niveles relativamente constantes durante la conidiación, pero se induce su expresión pasajeramente en un medio carente de nitrógeno. Al reemplazar al gen *tmpA* silvestre con una copia de *tmpA* con la proteína verde fluorescente hay un fenotipo algodonoso, aunque ligeramente menor al de la interrupción de *tmpA*. Esto indica que la proteína verde fluorescente disminuye la actividad de TmpA. Una de estas mutantes se utilizó para observar la localización de TmpA y se observó que TmpA se encuentra en la periferia de los conidios. Esto apoya nuevamente que es una proteína transmembranal. La sobre-expresión de *tmpA* con diferentes etiquetas en el carboxilo terminal a partir del promotor inducible

alcA provoca la conidiación. Esta conidiación es inversamente proporcional al tamaño de la etiqueta y directamente proporcional al número de copias. La sobre-expresión de *fluG* en una mutante $\Delta tmpA$ provoca esporulación. Una mutante doble $\Delta fluG$, $\Delta tmpA$ muestra un fenotipo aditivo, es decir, es más algodonosa que cada una de las mutantes simples. Por lo tanto *tmpA* se encuentra en una vía independiente de *fluG*.

Con estos resultados proponemos que TmpA es una oxidoreductasa de membrana que forma parte de una nueva vía que participa en la síntesis de una señal de esporulación.


```

1  CATTTCGGCAGGACGACACCAGACAACCAAGCGGGTCGGCGACACTTCTCTTTGTTGCCAATTGGTCTTACGGTATTCGGTATCTGGAGAAAAGAGGATCGAGAC
GTAAACCGCTCTCTGCTGGTCTGTTGGTTCGCCAGCCGCTGTGAAGAAAGAAACCAAGGTTAACCCAGGATGCCATAAGGCATAGACCTCTTTCTTCTAGCTCTG
108 AAGTACAGTAGGGTATCTTGTGTGTTGCACGTTATTGGTAAACCATATAGTGCCTTACTTGGCGGGTAAAGGTTCCGGTGGAGGTGCCACGCGGATGCACATGAAATTCG
TTACTGTATCCCCATAGAACAACAACGTCACATTAACCATTTGGTATATCACGGAATGAACCCGCCATTCGAAGCAACTCCACGGTGGCGCTACGTTACTTTAAGC
BamHI
215 AACGCTTGGGATCTACGACCCTTTGGCTGTCTGACCTCGGATCCAAGAACAATAGTTTCTTTTTCTGCTCGTTGGCGGGGGAAAAAACCCTTGAGAGA
TTGGAAACCCCTAGATGCTGGTGAACCCGACAGACTGGAGCTTAGTTCTTTGTATCAAAAGAAAAAGGACAGAGCAACGCGCCCTTTTTTTTTTGGAACTCTCT
322 TAAGGACGGTGTCTATAGTGGACCGTCTAATGTGGACCCAGGTTGCAAGAGGAACGATGGGCTAGGGCACGGCTGGAAGCCCGATGCGACGCCAACCTCTGGGA
ATTCTGCCACAGTATCACCTGGCAGATTACACCTGGGGTCCAACGTTTCTCTTGTACTCCGGATCCCGTGGCGACCTTTCGGGCTACGTCGGTGGGAGACCT
429 AATGCTCGTGTAGCTAAACAGATGGCGCTATGCATTCAAAAGACTCATGCATCTCGATGGAAACGACACATCCCAATGGTGGGCTGGTCTGTATTTAGTGT
TTACAGAGCAATCGATTGGTCTACCCGATACGTAAGTTTCTGAGTACGTAGGACGTACCTTGGCGTCTGTAGGTTACCAACCGAACCCAGGCATAGATCACA
536 ATGAGTGCAGCCACACATCGTGTCTTCCACCTTACCTACCCATTTCACTGTACACCATACGCCATATATCTCTGTGACTCGAGGTGTAGCTCTCGAA
TACTTACGCTTCGGTGTAGCGACGAGAAGTGGTGAATGGAGTGGGTAAGTGACGATGGTATGCTGGGTATATAGGAGACAACCTGAGCTCCACATCGAGAGCTT
643 ACATTCAAGGCCATGTCTCAGCCGGAAGAGGTTATCGTACCAGGCCGCCAACCGCAGTGTGCGTCCCAGAGAGCCCAAGCGAAAACCGCTTCTGTAACATTGAGA
TGTAAGTTCTCTTACAGAGTCCGGCTTCCCAATAGCAGTGGTCCGGCGGTGGCCGTCACACGCAAGGCTCTCTCGGGTTCGCTTTGGTGCAGGACCTTGTAACTCT
M S Q P E E V I V T R P P T A V C V P E S P S E T S F N I E
750 AATGCATCATCAAAGATGTTTCCGAGCTGATGTTACCCGATGAGCCTTCTTTTGTACTTGGGCTCAAAGCACGGCAAGAGATTGATTTCTCCAATCCGGTATACA
TTACGTAGTAGTTTCTCAAAGGGCTCGACTACAATGGGCTACTCGGAAGAAAACCTAGAACTCCGAGTTTCTGTCGGTCTTCTTAACTAAAGAGGTTAGGCCATATGT
K C I I K D V E S E L M L P D E P S F D L E A Q I S T A R R L I S P I R Y T
857 TTCTCAACATTTACCGGGACTCTTCCAGCTTGTGTTTCTCGCCAACTCGGAGTCTTCTGTCTATGTGATGGTTCGACAGCCGAAACTCTGCTGCTTCAATGC
AAGGAGTTGTAATGAGCCGCTGAGAAGTGCAGAACCAAGAGCGGTTGTAGCTCAGAAAGCAGATACAGTACCAACGCTGGCTTTGACAGCCGAGAGGATACG
F L N I Y R R L F T L V F L A N I G V F V Y V M V A D R K L L A L V N A
964 AGCAGCAGCAACTTGTCTGCATGTGGTCTGGCAAGCAACCTTTGGTGTCAACACCATTTTCTTACGGTATGCTCGATACCGAGATCCGACCGGCTATGGCTCC
FCGTCGCTGTTTGAAGAGGAGTACACAGACCGTTCGTGTTGAACCAACAGTTTGGTAAAGAAAGTGCATACGAGCTATGGCTAGGCGTGGCGGATGAGG
A A A N L L A C G L A R Q P L V V N T I F F T V C S I P R S A P L W L
1071 CGCGAATTCATCAAAGGTTACCATATGGGGGTTTATAGCGGATGGAGTGTGCTCTCTAATCTGGTATCTGGGTTTCAATCGGAGAAATCTCCGACAGTAC
CGCTTAAACGATTTCCACATGGTAATACCCCAAGTATCGCTACACCTCAACGGAGAGATTAGACCATAGACCCAAAGTACGCTCTTAAGAGGGCTGTCAATG
R R I A S K V Y H Y G G V H S G C G V A S L I W Y L G F I G E F S R Q Y
1178 TGGTCCGGAAAGCTCATCTCTTTCTCAGCAGCCGCGATAGTCTGGCATAATCATCTAGTGTGCTGCTTGGCATCATCTGTCGCCTACCCAATTTCCGAT
ACCAGCCCTTCGAGTAGAGGAAAAGTCTGTCGGCTATCAGGACCGTATGTAGTAGGATCAGCAGCAGCAACCGCTAGTAGCAGCGGATGGGTTGAAGGCTAA
W S G S S S P F S A A P I V L A Y I I L V L L L A I I I V A Y P T F R F
1285 CAAGCGGCACGACTATTTCCGAGCTCACGCACCGCTTCTCCGGCTGGCTCATCGTGGCCCTCTTTGTCTTCTCTCATGGTCTTCCGTCAGCAAGCTTCCGCGGGC
GTTCGCGCGTGTGATAAAGCTCGAGTCCGTGGCGAAGAGCCGACGGLTAGCACCGGAGAAAACAGTAAAGAGGATACCAAGACAGCTGCTTCCGAAGCCGCGCC
K R H D Y F E L T H R F S G W L V A L F V I L L M V F D E A S A C
1392 AAGGCAAAACCAATGGGCGCTTCTAATCGAGCTGCGAGCTTTCTGGTTCCTCATGCTTGTGTTATAGCCATATACACCCATGGCTCTCTCTCCGCAAGTCAAA
TCCGTTTGGTTCACCGCAAGGATAGCTCGAGCTCGAAAGACCAAGGATACGAACCAATAATCGGTAGTATGTTGGTACCAGGAGGAAAGCTTTCAAGTTT
E G K P M G R F L I E L P A F W F L M L V V L A I I H P W L L R K V K
1499 GTACCCCAAGAAATACCTCTCCCGCAGCCGCTGCGGCTCCACTTCTCTCACAAACCAACACCTTCCGCAAGGCAATCCAGCTCTCCAAGCATCTTTGCAAGATTG
CAGTGGGCTCTTATGAGAGGGGGCTGCGGCACCGGAGGTGAAGAGAGTGTGTTGGTGGTGAAGCCCTTCCCGTAGTCTGAGGAGTTCGTAGGAAACGTTCTAAC
V T P E Y L S P H A V R L H F S H T T T T F G K G I Q L S K H P L Q D W
1606 GCACGGCTTCGCCACTTCCCGGACGTCGATAGAGACGGCAAGAGCTTCTCTAGCTTGTCTCCAAGCCGCGACTGGACCGCCGCCACAATCAAAGTCAACCAA
CGTCCGAAGCGGTGGAAGGGCTGCACTCTCTGCGGTTCTCGAAGAGATCGGAACAGAGGTTTCCGGCCGCTGACCTGGCGCGGTTAGTCTTCTAGTTGGT
H G F A T F P D V D R D G K S F S S L V S K A G D W T A A T I K D Q P
1713 CACACCTTCGAAACCGCGCTGTGATCTATGGCTTCGCATACGCAATCGGGTATACAAGCGTGTGCTGTTGGTACCAACAGGCTCCGGCATCGGGCCCTGTCTC
GTGTGGAGACTTTTGGCGGCACGACTAGATACCGAAGCGTATGCGTTACGCCATATGTTCCGACAGCAGCACCAGTGTGTCCGACAGTACGCCCGGACAGAG
T H L W K R G V L I Y G F A Y A M R V Y K R V V V V T T G S G I G P C L
1820 TCATTCTTGGAGACGAGAACCAGCCCTCGCTACGAGTGTCTGGCAACCGGAGCCCAAGCGAACGACGAGCAAGAGGTTCTCAATCTTGTGCGGACGATGGA
AGTAAGGAACCTTCTGCTTGGCGGGGAGCGTGTCTACTAGACCGTGTTCGCTCGGGGGTTCGCTTGCATGCGGTTTCTCCAGGATTTAGAAGACGCTGCGTACCT
S F L G D E N R P S L R V I W Q T R A P K R T Y G K E V L N L V G R M D
1927 TCCGAATCCCGTCAATCATGACAGAAATTCATCCGGCGCTCGACATGGTGGCGGCTATTGGCAGATGACAGGAGAACAGATGCGAGGCGATATGTTTATCA
AGGCTTAGGGCAGTAGTGTGCTTAAATAGCCGGCAGAGCTGTACCCAGGCGTAAAGCGTCTAACGCTGCTTGTGCTACGGCTCCGCTATACCAATAGT
P N P V I I D T N S S G R L D M V P V I R Q I A R E H D E A C I C V I
2034 GTAATCCATTGTGACGAAAAGTGTGTACGAACTCGAGTGTGAGGAAATCCCGCGTATGGGCAATTTGATTGATGATTTCCGATGATCCTTACGCTGT
CATTAGGTAACAGTGTCTTTTTCAACACATGCTTGAAGTACGTTACCTTGGGGCGCATACCCGGTTATAACTAAGTACTAAAGGCTACGTAGTAAATGCGACA
S N P F V T K K V V Y E L E S M G I P A Y G P I F D S
2141 AATGATTCGATGGAACGA TTATTTAGAGATATATAGTTGAATTTCTGCTATCTGCGTCAATCAATATAATGATAAATGTTGCTT GAGGTTTGGATGATCAGTT
TTACTAAGCTACCTTGTCT AATAAATCTCTATATATCAACTTAAGACGATAGACGACGATTAGTTATATTACTATTTCAACAGAA CTCCAAACCTCACTAGTCA
2246 GCAGAGATGTGAGACTCAGTGGGGCCATGTGCGTTATAACATACCAAGTGGGAGACGTGAGA
CGTCTCTACACTCTGAGTCACTCCCGGTTACACGCAATATTGTATGGTCAACCTCTGCACTCT

```

Fig i. Secuencia genómica del gen *tmpA* y de la proteína que codifica. El gen *tmpA* carece de intrones. En verde se indica el sitio BamHI, donde comenzó el rearreglo genético y se insertó el pDC1. En magenta se indican los sitios Sall y Apal, que flanquean la región donde se sustituyó el gen *tmpA* por el gen *argB*. El sitio teórico de la señal de poliadenilación se indica en naranja con letras más grandes. El sitio donde termina la transcripción de *tmpA* se indica en azul con letras más grandes.

TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*

Gabriela Soid-Raggi, Olivia Sánchez and
Jesús Aguirre*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de
Fisiología Celular-UNAM, Apartado Postal 70–242,
04510, México, D.F., México.

Summary

Asexual reproduction (conidiation) in *Aspergillus nidulans* is induced by environmental signals like exposure to air or nutrient starvation, and depends on *brlA* gene activation. The study of ‘fluffy’ mutants showing delayed asexual development and reduced *brlA* expression has defined the *fluG* pathway, involved in regulation of this differentiation process. Genetic characterization of a ‘fluffy’ mutant identified *tmpA* as a new gene involved in regulation of conidiation. TmpA defines a new family of putative transmembrane proteins of unknown function, widespread in filamentous fungi and plants, with homologues showing similarity to non-ribosomal peptide synthetases. The deletion of *tmpA* resulted in decreased *brlA* expression and conidiation in air-exposed colonies. This defect was suppressed when $\Delta tmpA$ mutants were grown next to wild-type or $\Delta fluG$ mutant colonies, even without direct contact between hyphae. In liquid culture, *tmpA* was essential for conidiation induced by nitrogen but not by carbon starvation, whereas the overexpression of different *tmpA* tagged alleles resulted in conidiation. The overexpression of *fluG*-induced conidiation independently of *tmpA* and $\Delta tmpA \Delta fluG$ double mutants showed an additive ‘fluffy’ phenotype, indicating that *tmpA* and *fluG* regulate asexual sporulation through different pathways. TmpA and its homologues appear to have diverged from the ferric reductase family, retaining overall transmembrane architecture, NAD(P), flavin adenine dinucleotide (FAD) and possibly haem-binding domains. Based on our results, we propose that TmpA is a membrane oxidoreductase involved in the synthesis of a developmental signal.

Introduction

Understanding how living organisms co-ordinate growth and reproduction is a central problem in biology. In bacteria, numerous studies have shown that events such as virulence, sporulation and mating are regulated through diverse chemical signals, in a process known as quorum sensing (Bassler, 2002). The study of the asexual reproductive cycle (conidiation) of the fungus *Aspergillus nidulans* has provided valuable information on mechanisms involved in regulation of growth and development in microbial eukaryotes (Pontecorvo *et al.*, 1953; Clutterbuck, 1969; Adams *et al.*, 1988; Martinelli and Kinghorn, 1994; Timberlake and Clutterbuck, 1994; Tsitsigiannis *et al.*, 2004). Asexual reproduction in this and other filamentous fungi is preceded by a phase of vegetative growth, characterized by formation of aggregates of undifferentiated hyphae or mycelia. Conidiation is triggered by environmental signals like exposure to air (Timberlake and Clutterbuck, 1994; Adams *et al.*, 1998) or nutrient starvation (Skromne *et al.*, 1995) and involves the formation of multicellular structures called conidiophores, which produce multiple chains of spores or conidia (reviewed by Adams *et al.*, 1998). Conidiophore development depends on the activation of the *brlA* gene (Clutterbuck, 1969; Johnstone *et al.*, 1985), which encodes a zinc-finger transcription factor, needed to regulate several genes and conidiophore pattern formation (Adams *et al.*, 1988; Mirabito *et al.*, 1989; Aguirre, 1993; Aramayo and Timberlake, 1993; Prade and Timberlake, 1993; Timberlake and Clutterbuck, 1994).

The study of different ‘fluffy’ mutants, showing a characteristic proliferation of undifferentiated hyphae, delayed asexual development and reduced *brlA* expression (Dorn, 1970; Wieser *et al.*, 1994), has defined two major pathways involved in regulation of growth and conidiation (Adams *et al.*, 1998). In a heterotrimeric G protein pathway, $G\alpha$ subunit FadA and its regulator FlbA stimulate vegetative growth and inhibits conidiation (Yu *et al.*, 1996). In contrast, the *fluG* pathway, composed by genes *fluG*, *flbB*, *flbC*, *flbD* and *flbE*, is involved in activation of conidiation (Adams *et al.*, 1998). *fluG*, the most upstream component in this pathway (Lee and Adams, 1996), encodes a putative cytosolic enzyme that shows similarity to prokaryotic glutamine synthetase I in its C-terminal half

(Lee and Adams, 1994a). Overexpression of only this part or full-length FluG results in *brlA* expression and conidiation under conditions that normally suppress it. This, and the fact that conidiation in null *fluG* mutants is rescued by neighbouring wild-type or other 'fluffy' mutants has led to propose that FluG is involved in the production of a diffusible molecule, related to glutamine or glutamate, needed to activate conidiation (Lee and Adams, 1996). *flbB* (J. Wieser and T.H. Adams, pers. comm.), *flbC* and *flbD* encode putative transcription factors (Wieser and Adams, 1995) and *flbE* does not show clear similarities (J. Wieser and T.H. Adams, pers. comm.).

Through genetic characterization of a 'fluffy' mutant obtained by restriction enzyme-mediated integration (REMI), we have identified a novel gene called *tmpA*, which regulates *brlA* expression and conidiation in a *fluG*-independent pathway. TmpA (trans-membrane protein A) defines a new family of plant and fungal transmembrane proteins of unknown function, which contain putative NAD(P), flavin adenine dinucleotide (FAD) and perhaps single haem-binding domains. This, and the fact that conidiation of *tmpA*-deleted mutants is rescued by adjacent wild-type or other developmental mutants, suggest that TmpA is involved in the production of a molecule, different from the *fluG* factor, required to regulate asexual development.

Results

The 'fluffy' mutant BL001 defines the *tmpA* gene

We previously used REMI mutagenesis to tag genes involved in *A. nidulans* asexual development. Among several mutants screened for conidiation defects, strain BL001 showed a 'fluffy' phenotype characterized by a cotton-like colony appearance and a clear delay in conidiation. Genetic analysis of this mutant showed linkage between the single pDC1 vector integration event conferring arginine prototrophy and the 'fluffy' morphology (Sanchez *et al.*, 1998). In addition, diploid complementation tests indicated that mutant BL001 was affected in a gene different from *fluG* and *flbA-E* (Lee and Adams, 1994a; Wieser *et al.*, 1994). To identify the gene affected in mutant BL001, genomic DNA was digested and recovered in *Escherichia coli* as plasmid pREMI1. The inserts flanking the original pDC1 vector were used to hybridize a chromosome-specific library (Brody *et al.*, 1991). One of these inserts identified cosmid W19A10, which fully complemented BL001 mutant phenotype. A 13.8 kb EcoRV complementing fragment from cosmid W19A10 was subcloned in plasmid pGS12 and sequenced. As shown in Fig. 1A, DNA sequence revealed putative genes *afeA* and *tmpA*. Subclone pGS16, containing only the *tmpA* gene, complemented BL001 'fluffy' phenotype, suggesting that this phenotype was due to mutation of *tmpA*.

However, Southern blot analysis (not shown) using wild-type and BL001 genomic DNA indicated that inserts in pREMI1 were not contiguous in the wild-type strain and that part of the *tmpA* coding region was still present in BL001 genome, suggesting that a DNA rearrangement had occurred in this mutant. Indeed, BLAST analysis of pREMI1 right and left inserts against *A. nidulans* genome (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>), released subsequently, indicates that pDC1 REMI insertion in strain BL001 occurred in chromosome VIII supercontig 1, between contigs 3 and 16, possibly resulting in translocation of the ~3.3 MB region located between these contigs. The fact that pREMI1 right and left inserts are in direct orientation with respect to supercontig 1 in chromosome VIII rules out an inversion of this ~3.3 MB region and indicates that it was translocated to other region in chromosome VIII or to other chromosome. In any case, pDC1 REMI insertion resulted in separation of the *tmpA* coding region from its promoter (Fig. 1A).

To confirm that BL001 phenotype was solely due to mutation of *tmpA*, we generated disruption vector pGS19 in which a central region of *tmpA* (encoding amino acids 239–384) was replaced by the *argB* marker, and used this plasmid to transform strain RMS011 to arginine independence. Among 150 transformants obtained, 23 showed a phenotype similar to BL001 and 11 were analysed by Southern blot. As shown in Fig. 1B and C, strains TGS6–10 contain the expected *tmpA*-disruption event, indicating that disruption of this gene results in the delayed sporulation phenotype. Furthermore, diploid strains generated between mutants TGS6–10 and BL001 had a 'fluffy' morphology, confirming that all these mutants are affected in *tmpA*.

tmpA encodes a member of a novel family of putative membrane proteins present in fungi and plants

As indicated, plasmid pGS16 (Fig. 1A) complemented BL001 phenotype and contained a continuous open reading frame (ORF) of 1461 bp designated *tmpA* (GenBank accession no. AY254382). Sequencing of a cDNA isolated by RT-PCR and comparison of both genomic and cDNA sequences confirmed that *tmpA*-coding region is not interrupted by an intron. TmpA-deduced polypeptide is identical to hypothetical protein AN0055.2 present in the *A. nidulans* genome database at the Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>), being 486 amino acids long, with a calculated mass of 54 448 Da and a predicted isoelectric point of 9.5. TmpA contains five putative transmembrane domains, and shows high similarity to hypothetical proteins of unknown function present in filamentous fungi and plants (Figs S1A and S1B).

BLAST analysis of TmpA against proteins present at

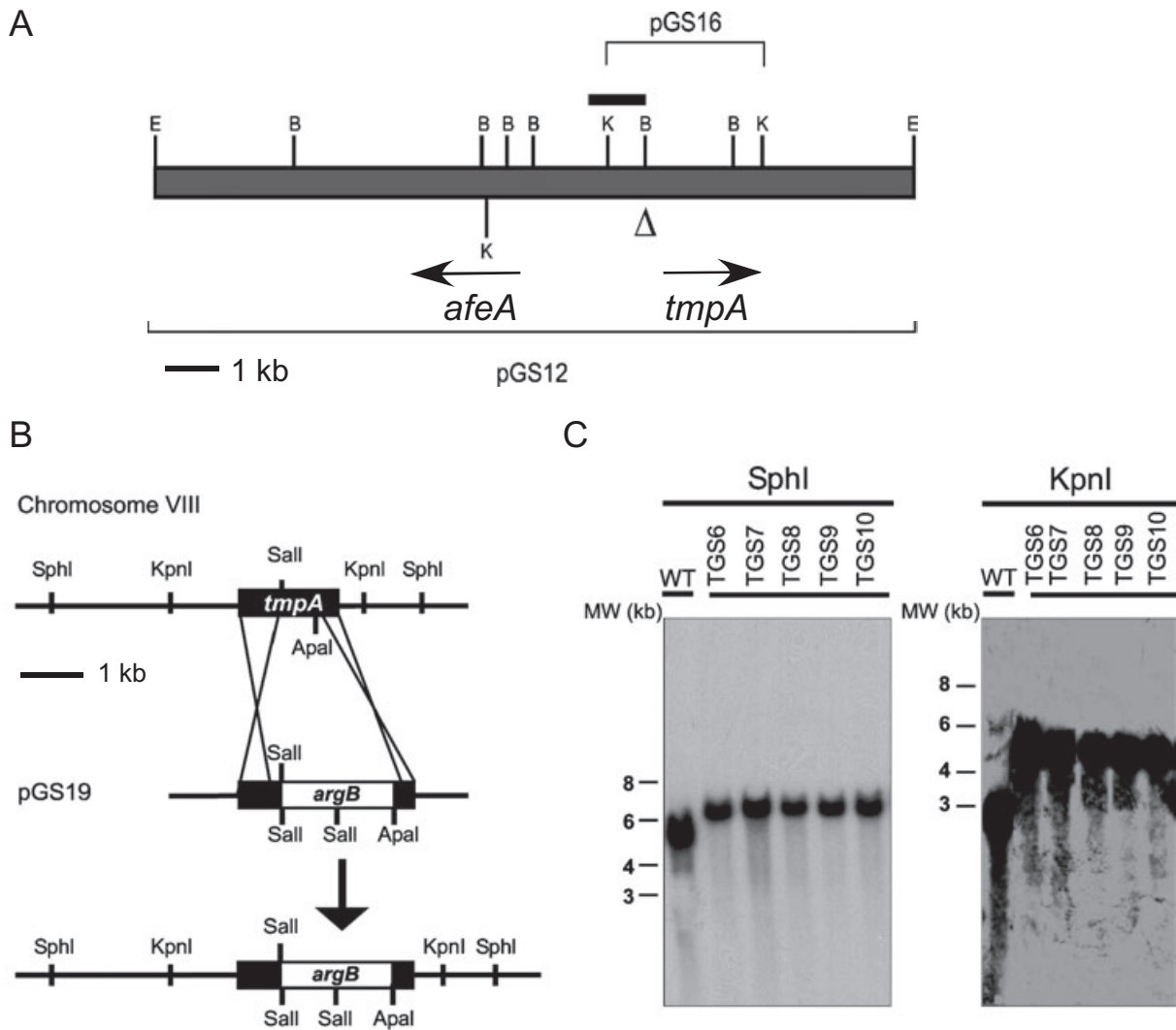


Fig. 1. *tmpA* cloning, physical map and gene disruption.

A. Chromosome VIII-specific cosmid W19A10 (Brody *et al.*, 1991) and subclones pGS12 and pGS16 complemented BL001 mutant 'fluffy' phenotype. Triangle indicates plasmid pDC1 BamHI insertion site in the mutant, which resulted in possible translocation of a large DNA region located to the right of the insertion point. The black bar indicates the DNA sequence in the plasmid (pREMI1) recovered from BL001 mutant, which identified cosmid W19A10. Plasmid pGS12 was sequenced and putative genes *afeA* and *tmpA* were identified. Restriction sites: E, EcoRV; B, BamHI; K, KpnI.

B. Plasmid pGS19 was constructed by removing a central region from *tmpA* (encoding amino acids 239–384) and replacing it with the *argB* gene as selectable marker. Linear pGS19 was used to transform the *argB*-deleted strain RMS011 to arginine independence.

C. Total DNA from strains RMS011 (wild-type) and five transformants with fluffy phenotype (TGS6–TGS10) was digested with indicated restriction enzymes and used for Southern blot analysis, using pGS18 *tmpA* KpnI fragment as probe, which spans *tmpA* ORF. Probing the same blot with *argB* gene also gave results consistent with integration event shown in panel B.

GenBank or deduced from fungal genome databases detected two sets of homologous proteins. The first set includes TmpA and other fungal and plant proteins with sizes between 483 and 685 amino acids, whereas the second group is composed of larger proteins ranging from 933 to 1026 amino acids, up to now detected only in filamentous fungi. All large TmpA homologues are hybrid proteins composed of a 'TmpA-domain' fused to a conserved AMP-binding domain (Conti *et al.*, 1996;

Finking and Marahiel, 2004) at their N-terminal half (Fig. S1B and Fig. 2). The AMP-binding domain in *A. nidulans* AN9129.2 (GenBank accession no. EAA61962) and other homologues shows high similarity to adenylation domains (A) of the non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) LgrC, involved in gramicidin biosynthesis in *Bacillus brevis* (Kessler *et al.*, 2004) and to NPS12, a recently found putative NRPS from *Cochliobolus heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005). In comparison with

'small' TnpA homologues, the larger proteins contain an additional putative transmembrane domain. Phylogenetic analysis of all available TnpA homologues, using only the highly conserved 'TnpA-domain', clearly separates small and large homologues in two subgroups consistent with known phylogenies (Fig. 2). In the small-type group, plants and fungi form different clades, with three fungal subgroups all belonging to the ascomycetes (i.e. *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium graminearum*). The large-type TnpA homologues are all fungal proteins from both the ascomycetes and basidiomycetes (i.e. *Phanerochaete chrysosporium* and *Coprinus cinereus*). Fungi like *Neurospora crassa* contain two small TnpA homologues, others like *A. nidulans* contain one small and one large, whereas *F. graminearum* contains one undetermined (see Fig. 2

legend), one divergent small and three large TnpA homologues (Fig. 2).

Although not clearly related to proteins of known specific function, all TnpA homologues share characteristics that suggest possible functions. First, they show conservation in the number and/or position of putative membrane spanning domains (Fig. S1A and B). Second, NCBI conserved domain BLAST searches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) identify a ferric reductase (FRE) domain in some (for example *A. nidulans* AN9129.2, with an *E*-value of 0.004) but not all TnpA homologues, suggesting that the TnpA family might be distantly related to the FRE group. This large family includes membrane proteins like FRE (Shatwell *et al.*, 1996) and NADPH oxidases (NOX) (Shatwell *et al.*, 1996; Lara-Ortiz *et al.*, 2003; Lambeth, 2004; Aguirre *et al.*,

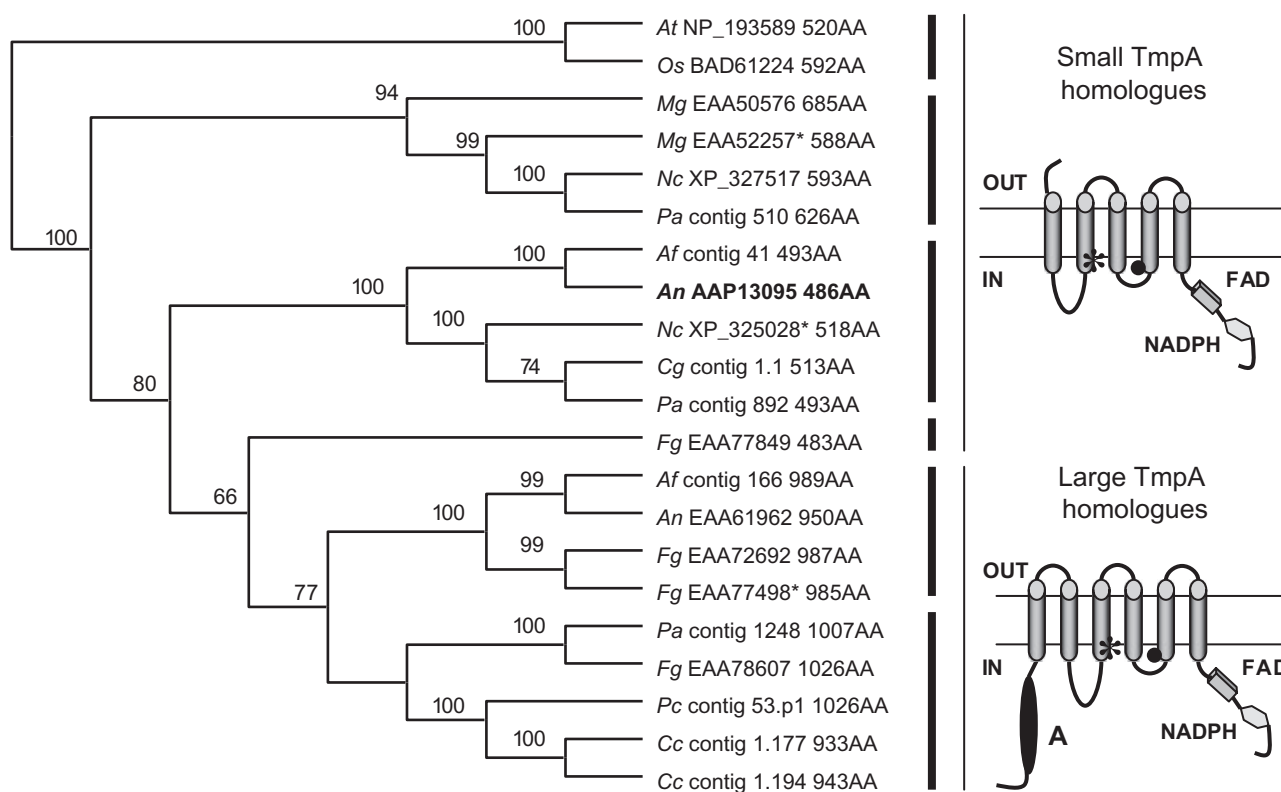


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the TnpA family. TnpA homologues were aligned with ClustalW and the phylogenetic tree was constructed based on the 'TnpA domain', starting at the highly conserved F76 residue in TnpA, using the distance-based method UPGMA. Tree was calculated using MacVector 7.2. Numbers at the nodes are percentages of 2000 bootstrap replicates in which that node was recovered. Species name initials followed by GenBank accession or contig numbers and protein size, identify each sequence. Right panel shows schematic representations of small and large TnpA homologues, according to predicted transmembrane, adenylation (A), FAD and NAD(P)-binding domains (see text). Dark dots at the base of the penultimate transmembrane domains indicate a histidine conserved in all TnpA homologues (Fig. S1), FRE and NOX (Fig. S2), putatively involved in iron haem co-ordination. The asterisk at the base of another transmembrane domain indicates a histidine highly conserved in TnpA but not in FRE/NOX families. Asterisks in GenBank accession numbers indicate proteins that appear incorrectly annotated, based on conservation breakdown, and were deduced manually as indicated in Fig. S1. Additional TnpA homologues detected in *F. graminearum* (EAA71519) and *C. cinereus* (contig 1.195) were not included in this analysis. EAA71519 seems a large TnpA homologue but it was not possible to deduce the protein with confidence, while *C. cinereus* protein is a small class homologue, but corresponding DNA sequence was truncated. Organisms names are: At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Nc, *Neurospora crassa*; Pa, *Podospira anserina*; Af, *Aspergillus fumigatus*; An, *Aspergillus nidulans*; Cg, *Chaetomium globosum*; Fg, *Fusarium graminearum*; Pc, *Phanerochaete chrysosporium*; Cc, *Coprinus cinereus*.

2005), which take electrons from NADPH in the cytoplasm and transfer them across the membrane via FAD and two bis-histidine haems to ferric iron and oxygen respectively. TmpA and NADPH oxidase NOX3 show low overall similarity. However, the number and position of most putative transmembrane domains, and several amino acids predicted to participate in NADPH and/or FAD binding are conserved in both NOX3 and TmpA (Fig. S2), as well as in all TmpA homologues (Fig. S1A and B).

Except for the TmpA homologue from *Arabidopsis thaliana*, all other contain a GSGIGP consensus sequence (Fig. S1A and B), which is highly conserved in flavoproteins that bind both FAD and NADPH (Dym and Eisenberg, 2001). Despite the low overall sequence identity among NAD(P)-binding domains, many share a core topology from the 'Rossmann' fold, and all contain a fingerprint region that includes GXGXXG or GTGIXP phosphate-binding consensus sequence (Rossmann *et al.*, 1974; Bellamacina, 1996; Dym and Eisenberg, 2001). To further support the idea that TmpA and its homologues are flavoproteins, we modelled TmpA carboxy-terminus (last 250 amino acids) using *Azotobacter vinelandii* NADPH:ferredoxin reductase as template (Sridhar-Prasad *et al.*, 1998), as FRE or NOX crystal structures are not yet available. Despite the limitations imposed by the low identity between these two proteins, the resulting TmpA model shows that as in ferredoxin reductase, putative NAD(P)⁺ and FAD-binding sites are adjacent in a cleft formed by association of the two domains. In both proteins (Fig. S3), the NAD(P)⁺-binding GTGIXP conserved motif (left domain, white colour) is located right after a β -sheet and shows similar orientation, leaving a space where NAD(P)⁺ can be fitted (not shown). The second domain in ferredoxin reductase interacts with the phosphate of the flavin adenine mononucleotide (FMN) moiety in FAD through the RXY[ST] motif (right domain, white colour), also conserved in many FAD-binding proteins (Sridhar-Prasad *et al.*, 1998; Dym and Eisenberg, 2001). The corresponding region in TmpA (amino acids 293–297, in white colour) contains residues RLHFS, from which RLHF are highly conserved in TmpA homologues (Fig. S1A and B). In summary, our analysis suggests that TmpA defines a new family of membrane flavoproteins present in fungi and plants, that like FRE and NOX might bind NAD(P), FAD and possibly haem.

The detection of a TmpA–GFP fusion is consistent with TmpA plasma membrane localization

The strong conservation in number and position of putative membrane spanning domains in all TmpA homologues supports the hypothesis that these proteins localize to a cell membrane. To test this idea, we used fusion PCR to generate a green fluorescent protein (GFP)

tagging construct as reported (Yang *et al.*, 2004), and used it to transform strain 11035. Southern blot analysis (not shown) of the four PyrG⁺ transformants obtained indicated that the tagged version of *tmpA* (*tmpA*–GFP) replaced the wild-type allele in all of them. Notably, these transformants showed a 'fluffy' phenotype, slightly less severe than a $\Delta tmpA$ null mutant, indicating that the GFP tag interferes but does not completely eliminate *tmpA* function. One of these transformants, strain TTMP–GFP1, was used to analyse the localization of TmpA–GFP in germinated conidiospores, by confocal microscopy. Results in Fig. 3 (upper panels) show a GFP fluorescence signal largely restricted to the periphery of the spores, whereas the signal in germ tubes is almost undetectable. In contrast, no fluorescence signal was detected in samples from a wild-type strain lacking the *tmpA*–GFP fusion (Fig. 3, lower panels). These results suggest that TmpA is a plasma membrane protein.

TmpA is required for expression of the brIA gene

The *brIA* gene is essential for conidiation in *A. nidulans* (Clutterbuck, 1969; Adams *et al.*, 1988). As mutation of *flb* genes results in 'fluffy' morphology and reduced *brIA* expression (Lee and Adams, 1994a; 1996; Wieser *et al.*, 1994; Wieser and Adams, 1995; Yu *et al.*, 1996), we analysed the expression of this gene using a *brIA::lacZ* reporter gene fusion (Aguirre, 1993). As shown in Fig. 4A, *brIA* expression is drastically reduced in a $\Delta tmpA$ mutant, when conidiation was induced by air exposure. This indicated that *tmpA* function is needed for *brIA* expression and prompted us to monitor *tmpA* expression under the same conditions. Results in Fig. 4B show that *tmpA* is expressed during growth and that its level of expression remains relatively constant after induction of conidiation.

Using a strain with *metG1* and *biA1* auxotrophic markers, Skromne *et al.* (1995) found that nutrient starvation induced asexual development after 18–20 h. Carbon starvation lead to high *brIA* expression levels and differentiation of conidiophores with reduced morphological complexity, whereas nitrogen starvation induced *brIA* more gradually and resulted in formation of fully developed conidiophores. To determine whether *tmpA* also mediated *brIA* expression under such conditions, we grew wild-type and $\Delta tmpA$ mutant strains for 18 h and then shifted them to the same medium lacking either nitrogen or carbon sources, and monitored conidiophore formation after 10 and 20 h.

Results in Fig. 5A confirm and extend those reported by Skromne *et al.* (1995), showing that in *pabaA1* auxotrophic strains conidiophore development occurs as early as 10 h after starvation. The presence of nutrients prevented conidiophore development in both, wild-type and $\Delta tmpA$ (not shown) strains, whereas carbon starva-

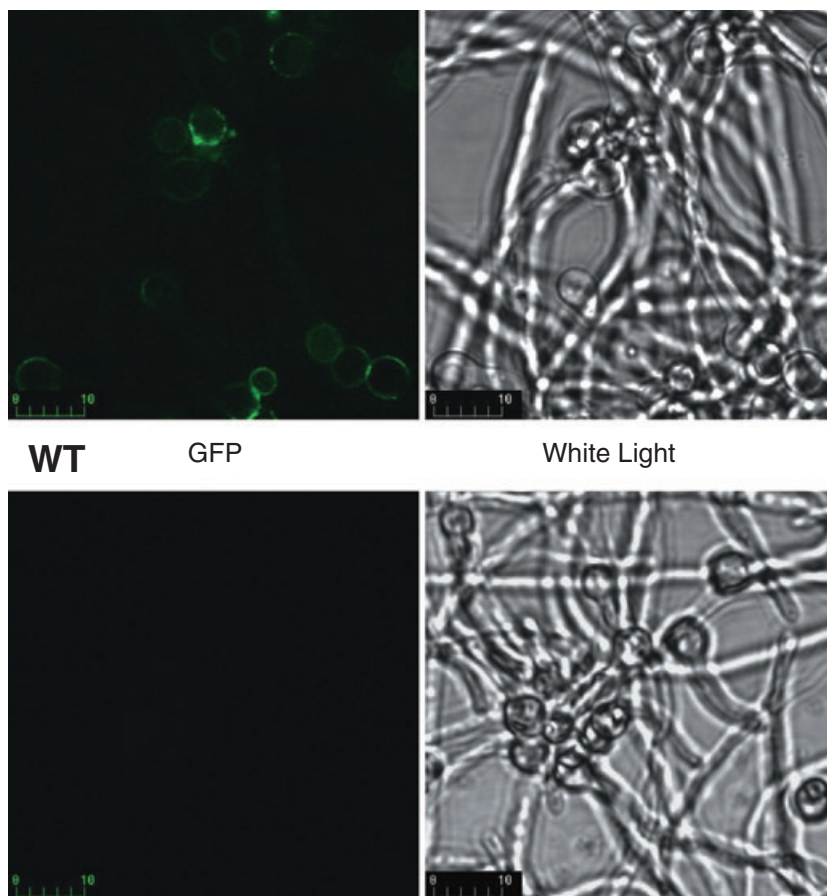
tnpA::GFP

Fig. 3. TnpA–GFP signal localizes to the periphery of germinated conidia. Conidia from strains TTMP–GFP1 (upper panels) and 11035 (lower panels) were germinated on glass coverslips as indicated in *Experimental procedures* and observed fresh by confocal microscopy to detect GFP fluorescence.

tion induced formation of conidiophores with reduced complexity (lacking vesicles and metulae cell types) in both strains. Under nitrogen starvation, the wild-type strain formed fully developed conidiophores, in sharp contrast with the $\Delta tnpA$ mutant, which failed to differentiate any conidiophore structure even after 20 h of starvation (Fig. 5A). In addition, we found that under nitrogen starvation β -galactosidase activity driven from the *brlA* promoter was less than half of the activity detected in the wild-type strain (Fig. 5B). Unexpectedly, under carbon starvation *brlA* induction was higher in the $\Delta tnpA$ mutant than in the wild-type (Fig. 5B). These results indicate that *tnpA* is required for full *brlA* expression and conidiation in both air-exposed colonies and nitrogen-starved liquid cultures. *tnpA* mRNA levels showed little change during conidiation induced by air exposure (Fig. 4B), but appear to be transiently accumulated during nitrogen starvation (Fig. 4C).

The overexpression of tnpA induces conidiation

After showing that *tnpA* was required for full conidiation,

we decided to explore if *tnpA* overexpression would cause sporulation in liquid medium. For this purpose we used PCR and *in vitro* recombination as reported (Toews *et al.*, 2004) to construct plasmids *palcA*-*tnpA*-mRFP, *palcA*-*tnpA*-3HA and *palcA*-*tnpA*, which would allow expression, from the inducible *alcA* promoter, of *tnpA* tagged with monomeric red fluorescent protein (mRFP), three copies of the influenza virus haemagglutinin epitope (HA), or a 42-amino-acid vector-derived peptide (Toews *et al.*, 2004) respectively. Many Arg⁺ stable transformants were obtained with these plasmids, except with *palcA*-*tnpA*, which generated only one transformant showing reduced growth. After Southern blot analysis (not shown), TTMP-RFP1, containing a single copy of *palcA*-*tnpA*-mRFP at *argB* and TTMP-RFP18, containing one copy of *palcA*-*tnpA*-mRFP at *argB* and three copies elsewhere, were chosen for further study. TTMP-3HA10, containing at least three plasmid copies, and TTMP-OvE1 also were selected for overexpression experiments. In the case of TTMP-RFP1 and TTMP-RFP18, qualitative *tnpA*-mRFP expression levels were assessed by examination of germinated conidia with epifluorescence or confocal microscopy (see

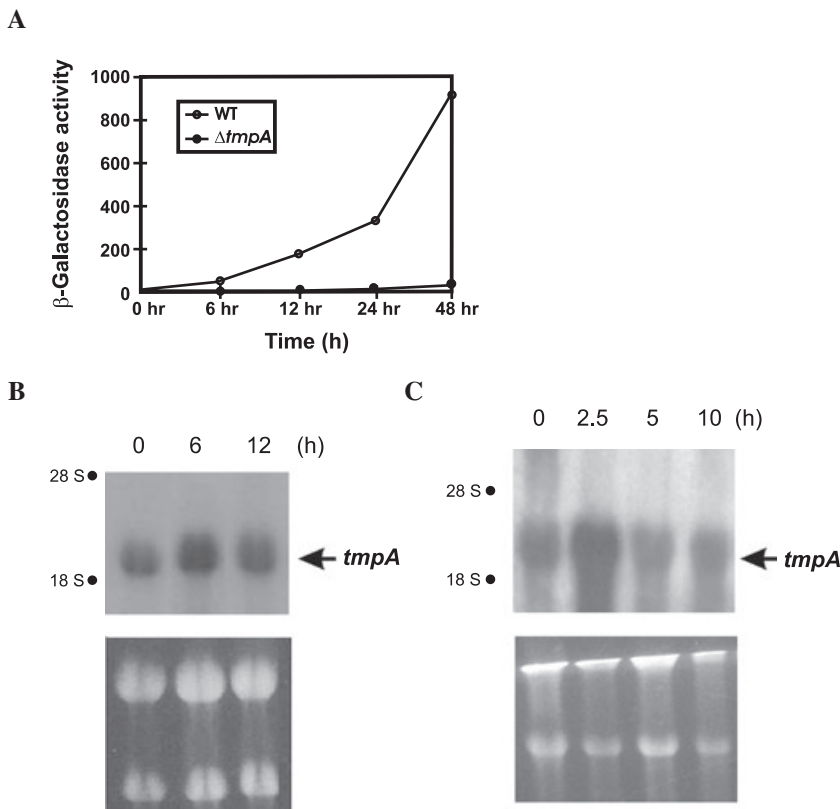


Fig. 4. *brlA* and *tmpA* expression during growth, conidiation and nitrogen starvation. A. Strains CGS12 (wild-type, WT) and CGS43 ($\Delta tmpA$) carrying a *brlA::lacZ* fusion (Aguirre, 1993) were grown for 18 h and induced to conidiate. Samples collected at indicated times were used to determine β -galactosidase activity. Specific activity corresponds to U (mg protein)⁻¹. Results are from a representative experiment.

B. Total RNA was isolated from strain CGS12 mycelia grown in liquid for 18 h (0 h) and induced to conidiate for 6 and 12 h.

C. Mycelia from strain CGS12 grown in liquid for 12 h (0 h) was transferred to liquid medium lacking nitrate for 2.5, 5 and 10 h. RNA blots from these samples were hybridized with a *tmpA*-specific probe. Positions of *tmpA* (arrow) and ribosomal (dots) mRNAs are indicated. Lower panels in (B) and (C) show ribosomal RNA as loading reference.

Experimental procedures); TTMP-RFP18 showing higher fluorescence levels than TTMP-RFP1. Selected transformants were grown in glucose medium, transferred to threonine to induce *alcA* expression, fixed and observed by electron scanning microscopy after 10 and 20 h. Under these conditions, relevant wild-type strains PW-1 and TJA22 (not shown), as well as strain TTMP-RFP1 (Fig. 6A), failed to develop any conidiophore structure. In contrast, strains TTMP-RFP18 (Fig. 6B) and TTMP-3HA10 (Fig. 6C) developed conidiophores after 20 h of induction. Notably, transformant TTMP-OvE1 (Fig. 6D) showed large numbers of conidiophores with reduced complexity and extensive hyphal vacuolization after only 10 h of induction. These results show that *tmpA* overexpression induce conidiophore development and suggest that as with GFP (Fig. 3 and corresponding section), mRFP and even smaller tags such as 3HA and a pMT-OvE-derived C-terminal peptide negatively affect but do not completely eliminate TmpA functions.

tmpA regulates conidiation through a *fluG*-independent pathway

The *fluG* gene is the most upstream component of a genetic pathway that regulates *brlA* expression and

conidiation in *A. nidulans* (Lee and Adams, 1994a; 1996; Wieser *et al.*, 1994; D'Souza *et al.*, 2001). To determine whether or not *tmpA* was part of the *fluG* pathway, we generated a $\Delta tmpA$ mutant containing an *alcA::fluG* genetic fusion (CGS47), which allows *FluG* overexpression from the *alcA* promoter and induces conidiation (Lee and Adams, 1996). Indeed, *fluG* overexpression induced conidiation in both TBN68.11 (*alcA::fluG*) and CGS47 (*alcA::fluG* $\Delta tmpA$) strains (Fig. 7A), indicating that TmpA is not a *fluG* downstream component. To confirm that *tmpA* and *fluG* regulate conidiation through different pathways, we compared morphology and conidiospore production in $\Delta tmpA$, $\Delta fluG$ and $\Delta tmpA$ $\Delta fluG$ double mutants, in relation to a wild-type strain. $\Delta tmpA$, $\Delta fluG$ and $\Delta tmpA$ $\Delta fluG$ 'fluffy' morphology was similar in 1–3 day-old colonies (not shown), but clear differences were observed in 5 day colonies (Fig. 7B). While wild-type strain presented homogenous conidiation, all three mutants displayed different levels of decreased conidiation. Although $\Delta tmpA$ mutant conidiated better than $\Delta fluG$ mutant, the double mutant $\Delta tmpA$ $\Delta fluG$ was severely impaired in conidiospore production (Fig. 7B and C), confirming that both *tmpA* and *fluG* genes are differentially required for asexual development in *A. nidulans*.

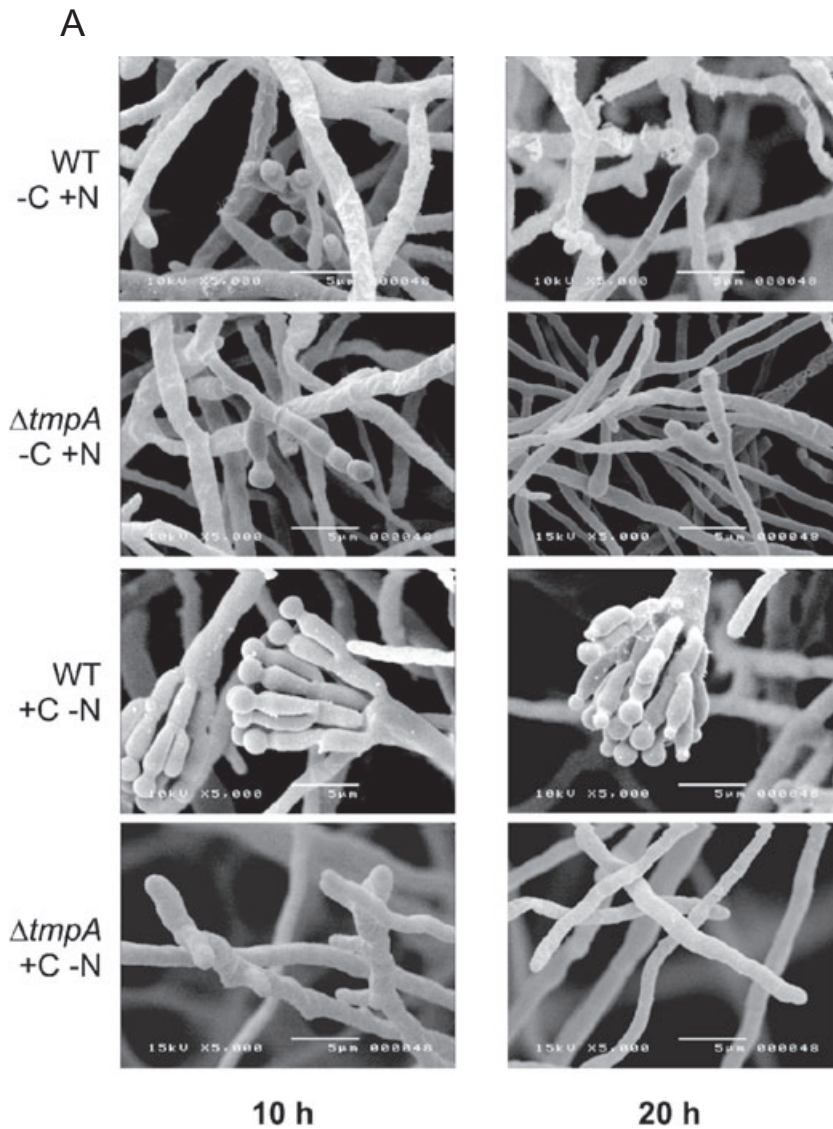
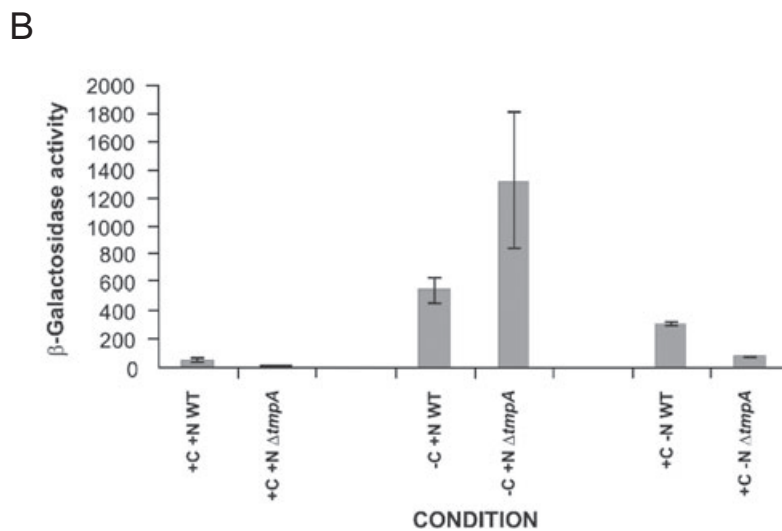


Fig. 5. The *tmpA* gene is required for sporulation and full *brlA* induction during nitrogen but not carbon starvation. (A) Mycelia from wild-type (CGS12) and $\Delta tmpA$ (CGS43) strains grown for 18 h were shifted to the same medium (+C+N) or media lacking either glucose (-C+N) or nitrate (+C-N). After 10 (left) and 20 (right) h, samples were fixed and processed for electron scanning microscopy, and 20 h samples were used to determine β -galactosidase activity (B). Specific activity corresponds to U (mg protein)⁻¹. Results are mean values from three independent experiments; bars represent standard deviation.



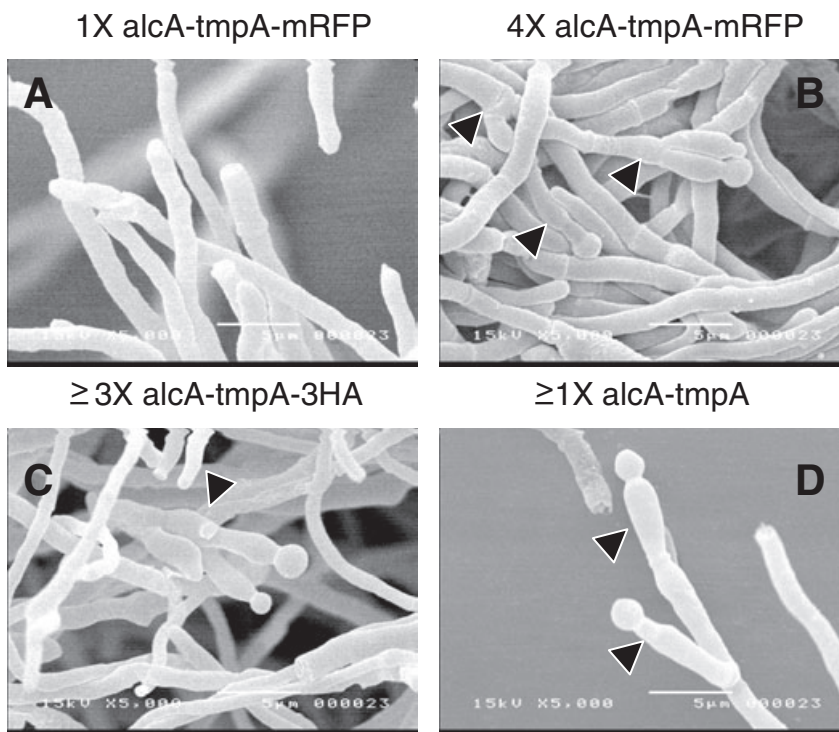


Fig. 6. Overexpression of tagged versions of *tmpA* induces conidiation in liquid culture. Strains TTMP-RFP1 (A), TTMP-RFP18 (B), TTMP-3HA10 (C) and TTMP-OvE1 (D) were grown in glucose medium for 14 h and then shifted to 100 mM threonine as sole carbon source for 10 (D) or 20 (A–C) h to induce *alcA* expression, fixed and observed by electron scanning microscopy. Arrowheads indicate conidiophores.

Conidiation defects in $\Delta tmpA$ mutants are suppressed by neighbouring wild-type and $\Delta fluG$ mutant strains

An attribute of $\Delta fluG$ mutants, not shared by other 'fluffy' mutants, is that they can be induced to conidiate when grown in proximity to wild-type or other sporulation defective mutants. This has led to propose that FluG is required to produce an extracellular factor needed to initiate asexual development (Lee and Adams, 1994a; 1996; D'Souza *et al.*, 2001). We have found that $\Delta tmpA$ mutants behave in a similar fashion. Figure 8A shows that when a green-spore $\Delta tmpA$ mutant is grown next to a yellow-spore wild-type strain, green-spore conidiophores are produced at the interface between the two colonies. Green spores recovered from this region plated on minimal medium generated 'fluffy' mutant colonies (not shown), indicating that they remained $\Delta tmpA$. In contrast, no sporulation was observed when two $\Delta tmpA$ mutant colonies were placed side-by-side. Furthermore, we observed the development of both green and yellow conidiophores at the interface between green-spore $\Delta tmpA$ and yellow-spore $\Delta fluG$ mutants (Fig. 8B), suggesting that extracellular cross-complementation occurs between these two mutants. To test this further, we asked whether extracellular complementation was also observed when wild-type and $\Delta tmpA$ mutant strains were separated by a membrane with a 0.4 μm pore size, to prevent hyphal anastomosis and heterokaryon formation. Results in Fig. 8C show that although the $\Delta tmpA$ mutant TGS6 retained part of its 'fluffy' phenotype, a green-spore wild-type strain clearly

induced the formation of abundant yellow conidiophores (left), whereas no conidiation was observed between two different $\Delta tmpA$ mutants (right). In addition, we found that conidiation of $\Delta tmpA$ mutant strain TGS6 was improved in conditioned medium from wild-type strain CLK43, but not from strain TGS6 (not shown). All these results support the idea that TmpA is required to produce an extracellular molecule, different from the FluG factor, which regulates asexual development.

Discussion

TmpA defines a novel family of transmembrane proteins present in fungi and plants

The molecular analysis of a 'fluffy' mutant obtained by insertional mutagenesis led us to identify *tmpA* gene as an important regulator of asexual development in *A. nidulans*. TmpA and its homologues present in fungi and plants are not related to proteins of known function, and therefore their specific biochemical functions are yet to be determined. However, we have shown a strong conservation in overall protein architecture and suggested possible functions. Along with the conservation in number and position of putative membrane spanning domains in all TmpA homologues, we found that localization of a TmpA–GFP fusion suggests that TmpA is a plasma membrane protein (Fig. 3). Although it is not clear why GFP signal was not observed all along germ tubes and hyphae, strains expressing a *tmpA*–mRFP fusion from the *alcA*

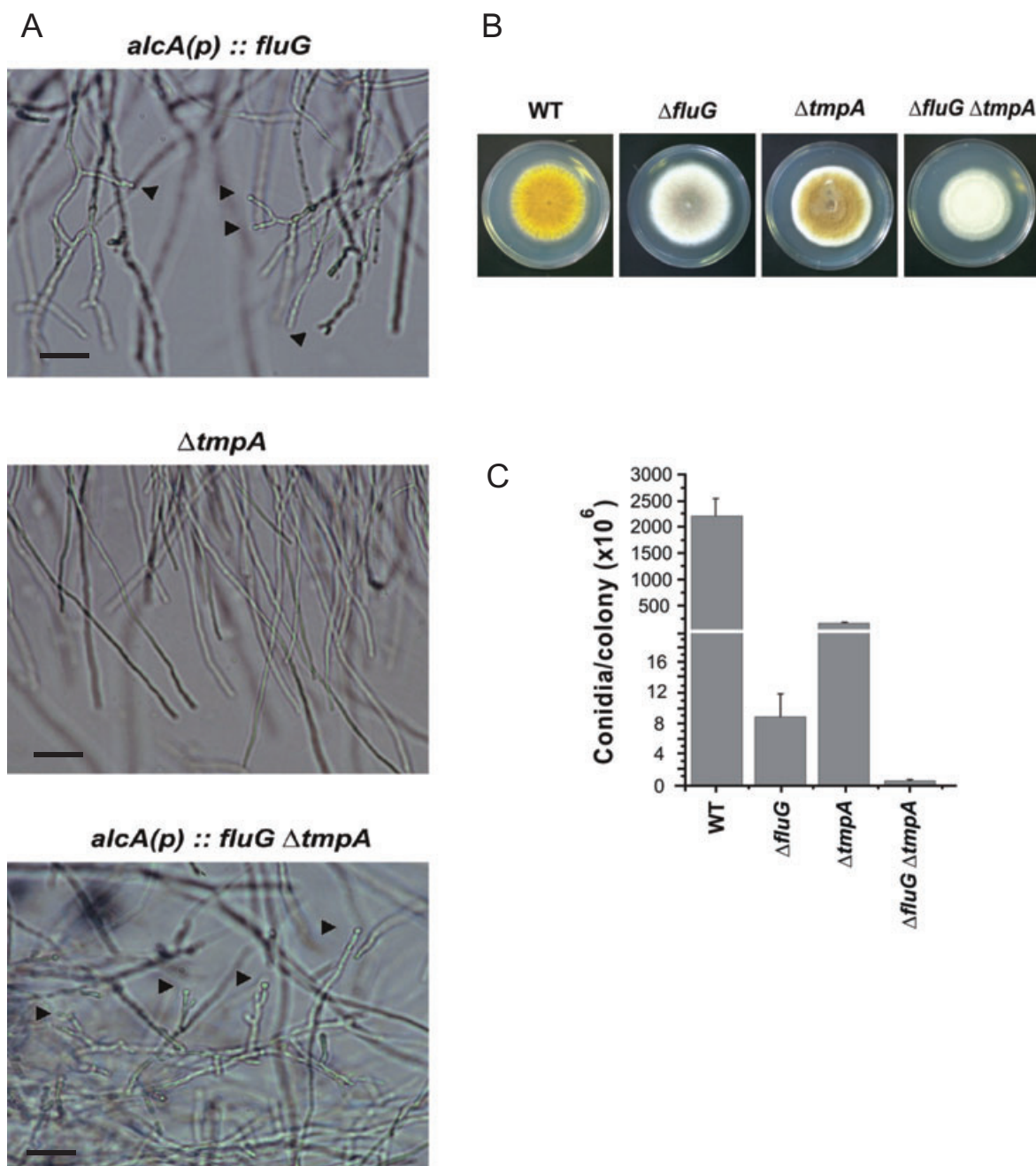


Fig. 7. *tmpA* and *fluG* are independently required for asexual development.

A. Strains TBN68.11 (*alcA(p)::fluG*), TGS6 ($\Delta tmpA$) and CGS47 (*alcA(p)::fluG* $\Delta tmpA$) grown for 14 h were shifted to threonine media to induce *alcA* expression and photographs were taken after 12 h.

B. Wild-type, $\Delta fluG$, $\Delta tmpA$ and $\Delta fluG \Delta tmpA$ strains were point inoculated and grown at 37°C. After 5 days, colonies were photographed from the top and conidia were counted.

C. Conidial yield data represent mean values from two colonies. Bars represent the standard error. Conidiophores are indicated with arrowheads. Scale bars = 10 μ m.

promoter also showed much higher fluorescence in germinated conidia than in hyphae (not shown). A low-signal confocal microscopy setting was necessary to detect both GFP and mRFP signals and it is possible that although distributed along the hyphae, TmpA–GFP stronger signal

could result from higher protein local concentration in germinated conidia. A TmpA plasma membrane-associated function is consistent with the fact that the sporulation defects in $\Delta tmpA$ mutants are rescued by extracellular complementation (Fig. 8).

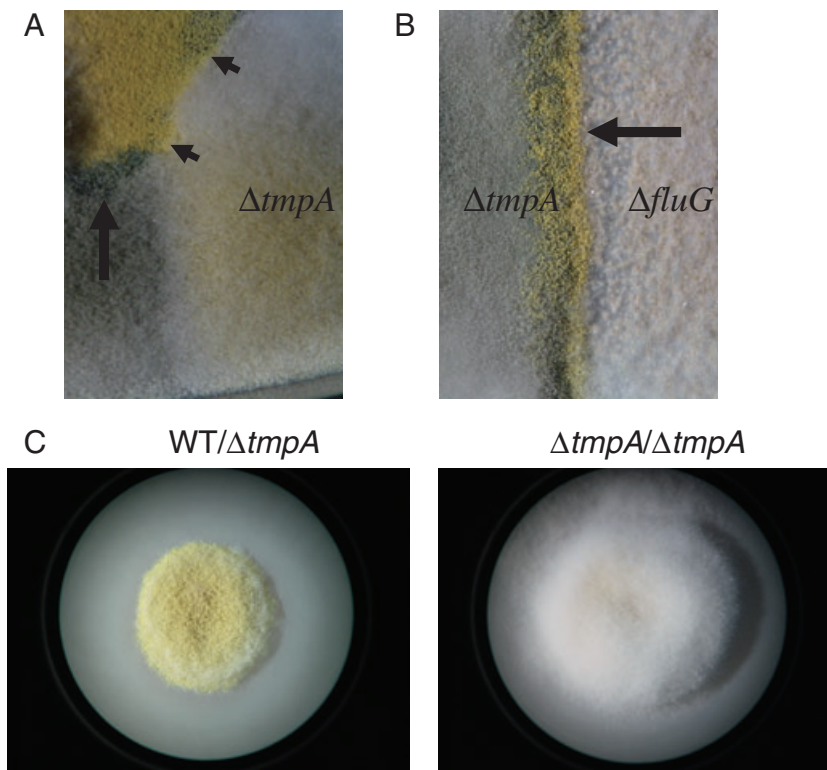


Fig. 8. Conidiation defects in $\Delta tmpA$ mutants are suppressed by contiguous wild-type (WT) and $\Delta fluG$ mutant colonies.

A. Strains CGS51 (WT), CGS52 ($\Delta tmpA$, bottom) and CGS53 ($\Delta tmpA$, right) were point inoculated next to each other and allowed to grow for 3 days. Note that a band of green conidiophores (arrow) is formed at the interface between the yellow-spore WT strain and the $\Delta tmpA$ strain in the bottom, whereas no conidiation band is formed between strains carrying a $tmpA$ deletion. A yellow band of conidiophores (arrowheads) formed between WT and CGS53 strains is less visible because both strains contain the $yA2$ allele, which confers yellow-spore phenotype.

B. Strains CGS45 ($\Delta tmpA$) and CGS49 ($\Delta fluG$) were point inoculated next to each other and allowed to grow for 4 days, until the edge of the colonies met each other. Note that a band of mixed yellow/green conidiophores (arrow) is formed at the interface between both strains.

C. Green-spore strains FGSC26 (WT, left) and CGS45 ($\Delta tmpA$, right) were point inoculated and grown for 18 h. After this time both colonies were covered with Isopore membrane filters (0.4 μm pore size), and the yellow-spore strain TGS6 ($\Delta tmpA$) was point inoculated on top of the membrane and further incubated for 54 h. See Table 1 for strain full genotypes.

Protein modelling of the C-terminal half of TmpA and conservation in sequence and position of NAD(P) and FAD phosphate-binding consensus sequences suggests that TmpA and its homologues bind NAD(P) and FAD. FRE and NOX enzymes also share a protein architecture consisting of five to six transmembrane domains and NADPH and FAD-binding domains at the C-terminal portion. Only one of four histidines predicted to bind haem in FRE and NOX (Shatwell *et al.*, 1996; Lambeth, 2004) is conserved in all but one TmpA homologues, whereas another histidine absent in FRE and NOX is conserved in most TmpA homologues (Figs. S1 and S2; Fig. 2). A single histidine in TmpA and its homologues could co-ordinate haem iron, in a fashion similar to peroxidases and oxidases. By analogy with FRE and diverse oxidases, electrons from NAD(P)H transferred via FAD would be used to activate O_2 bound to a haem group, to modify unknown substrates. Even without a haem, NAD(P)H and FAD could still be involved in oxygen activation and substrate oxidation as it occurs in several flavoprotein monooxygenases (Dym and Eisenberg, 2001). TmpA doesn't seem related to iron acquisition (Haas, 2003), as $\Delta tmpA$ mutants grow in low iron, produce siderophores and its conidiation defects are not remediated by supplementing high iron or triacetylfusarinine C or ferricrocin, the two major siderophores in *A. nidulans* (not shown).

Further indications on TmpA functions come from its high similarity to larger proteins, like *A. nidulans*

AN9129.2, containing one adenylation/activation (A) domain at their N-terminal end (Fig. S1B; Fig. 2). These types of domains, either as part of large multimodular NRPSs or as free standing proteins, are involved in the non-ribosomal synthesis of bacterial and fungal peptides such as antibiotics, immunosuppressants and toxins (Haas, 2003; Finking and Marahiel, 2004; Lee *et al.*, 2005). This A-TmpA architecture would result in activation of an amino acid substrate by the A domain and plasma membrane localization, and the TmpA domain might be involved in further modification of such amino acid or peptide. Likewise, TmpA as free standing membrane protein might be involved in oxidative modification and/or release of amino acids or peptides carried by soluble proteins with one or multiple A domains. In bacteria, different amino acids are covalently attached as aminoacyl-S-pantetheinyl enzyme intermediates and subject to specific oxidations by haem hydroxylases, in their route to secondary metabolism (Chen *et al.*, 2001). Although the exact function of TmpA and its homologues remains to be determined, we propose that $tmpA$ encodes a plasma membrane oxidoreductase involved in production of a regulatory sporulation signal.

TmpA regulates brlA expression and conidiation

We have demonstrated that $tmpA$ gene plays an important role in regulating asexual development by showing that it

is required for full *brlA* expression and conidiation and that overexpression of different *tmpA* alleles is enough to induce conidiation in liquid culture. Our results indicate that GFP and other tags interfere with TmpA function and that there seems to be an inverse correlation between tag size and residual TmpA function, which is consistent with the fact that several copies of the tagged alleles were necessary to induce conidiation. Plasmid integration at the *tmpA* locus would have allowed expression of untagged TmpA from the *alcA* promoter. However, the fact that transformants with this type of integration event were not obtained suggests that such event could result lethal or highly detrimental to growth, even in glucose medium.

As shown here for $\Delta tmpA$, other 'fluffy' mutants affected in *fluG* (Lee and Adams, 1996) and *flbB-E* genes conidiate well when starved for carbon but fail to do so when starved for nitrogen (O. Sánchez *et al.*, unpublished). In contrast, the *fadA* gene, encoding a heterotrimeric G α subunit is dispensable for conidiation in solid medium (Yu *et al.*, 1996), but required to sporulate in response to either carbon or nitrogen starvation (O. Sánchez *et al.*, unpublished). These results indicate that the *brlA* gene integrates multiple environmental signals and that some signalling pathways are common and some specific to the nutrient starvation and air-exposure inputs.

TmpA and *FluG* regulate conidiation through different pathways

We have shown that *tmpA* regulates asexual development in a *fluG*-independent pathway and that $\Delta tmpA \Delta fluG$ mutants are virtually aconidial. However, the fact that $\Delta tmpA \Delta fluG$ mutants can still sporulate in low glucose indicates that additional components mediate *brlA* expression in response to carbon starvation. FluG activity resides in the C-terminal half of the protein and it has been proposed that FluG is required for the production of an extracellular sporulation factor that accumulates to trigger conidiation and the production of the mycotoxin sterigmatocystin (ST) (Lee and Adams, 1994b; Hicks *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 2001). In contrast to FluG, TmpA doesn't appear to be involved in ST production, as $\Delta stcE \Delta tmpA$ mutants produce NOR (not shown), a fluorescent ST precursor (Butchko *et al.*, 1999). Like in $\Delta fluG$ mutants, conidiation defects in $\Delta tmpA$ mutants are rescued by growing them next to wild-type or even $\Delta fluG$ strains. Extracellular complementation is observed through a membrane that prevents hyphal contact between strains (Fig. 8C) but not through a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 12 kDa (not shown), suggesting that either the complementing factor is larger than 12 kDa or that its physicochemical properties limit its diffusion through this membrane. This and the fact that conidiation of $\Delta tmpA$ mutants is improved in conditioned media from a wild-type

but not from another $\Delta tmpA$ mutant support our proposal about TmpA being involved in the production of an extracellular compound, different from the FluG factor, which regulates asexual reproduction. Additional molecules, the PSI factors, have also been involved in regulation of development in *A. nidulans* (Tsitsigiannis *et al.*, 2004). In *Penicillium cyclopium*, Roncal *et al.* isolated a diterpenoid with conidiation-inducing activity, called conidiogenone, which seems to be produced by oxidation of its precursor. Conidiogenone is produced at early stages of growth, where it accumulates to induce conidiation (Roncal *et al.*, 2002).

The production of both, FluG and TmpA putative factors, doesn't seem to depend on increased expression of *fluG* and *tmpA* genes, during air-induced conidiation (Lee and Adams, 1994a) (Fig. 4). Either gene is enough to induce some conidiation in an air interface, but both are required to conidiate in response to nitrogen starvation, indicating that under different environmental conditions FluG and TmpA factors are differentially required to regulate conidiation. The isolation of suppressor mutations that bypassed *fluG* requirement and resulted in hyperactive conidiation led to propose that several genes regulate conidiation negatively and that *fluG* is required to remove such repression (Seo *et al.*, 2003). TmpA might be also involved in release of repressive factors or in direct activation of development. It will be interesting to determine whether TmpA homologues present in fungi and plants are also involved in developmental processes.

Experimental procedures

Cloning of tmpA, plasmid construction and PCR design

To identify the gene affected in mutant BL001, genomic DNA was digested with PstI and recovered in *E. coli* as plasmid pREMI1 (Sanchez *et al.*, 1998). pREMI1 insert, obtained by BamHI digestion, was sequenced by automatic fluorescence dedeoxy-sequencing in an ABI Prism 310 from Perkin-Elmer (Wellesley, MA). pREMI1 was digested with KpnI–BamHI and EcoRI–PstI, to generate left and right probes respectively, and corresponding fragments were used to probe a genomic library (Brody *et al.*, 1991). Right probe detected cosmids W5A10, W9H01, W25G02, W24G07, L27A01 and W28F02. Left probe identified cosmids L29G05 and W19A10. From all cosmids, only W19A10 complemented the mutant BL001 fluffy phenotype. A W19A10 13.8 kb EcoRV fragment was subcloned in QuanTox vector (Quantum Biotechnologies, Quebec) digested with SmaI to generate pGS12. Digestion of pGS12 with *Asp718* released a 2.7 kb fragment that was subcloned in Bluescript KS II (Stratagene, CA) digested with the same enzyme, to yield pGS16. Both pGS12 and pGS16 complemented BL001 'fluffy' phenotype. To generate *tmpA*-disruption plasmid, primers fluX37 with a SphI site (ACATG CATGCGCTGGGATGAGGAGAGTG) and fluX41 with a XbaI site (GCTCTAGATGGCTTGTCTGTATTC) were used to amplify a *tmpA* 2.7 kb fragment, using pGS12 as template. This PCR product was cloned in pTZ18R (Pharmacia LKB

Biotechnology, Uppsala) digested with SphI and XbaI to generate pGS18. The *A. nidulans argB* gene was obtained from plasmid pTLO6 (*argB* from pDC1 cloned as a BamHI fragment in Bluescript KSII; T. Lara-Ortiz, unpublished) digested with XhoI and Apal and cloned into pGS18 digested with Sall and Apal to generate pGS19, which was used to transform strain RMS011 (Stringer *et al.*, 1991). A *tmpA* cDNA was obtained using 3' RACE (Life Technologies, Gaithersburg) and primers UAP and fluX41, according to the manufacturer's protocol. An inducible TmpA C-terminal fusion with mRFP was generated using PCR and *in vitro* recombination (Gateway technology, Invitrogen) as reported (Toews *et al.*, 2004). TmpA ORF amplified with primers tmpA1 (GTGGCACCATGTCAGCCG) and tmpA3 (TGAATCAAATATTGGCCC) was cloned into plasmid GATEWAY pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad) according to the manufacturer's instruction to yield pTmpAENTR6. After confirming *tmpA* DNA sequence, pTmpAENTR6 was used for recombination with destination vectors pMT-mRFP, pMT-3xHA and pMT-OvE (Toews *et al.*, 2004) using Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad) as indicated by the manufacturer. The resulting plasmids palcA-tmpA-RFP, palcA-tmpA-3HA and palcA-tmpA were used to transform strain PW-1. Three PCR fragments were used to generate a TmpA C-terminal GFP replacement construct by fusion PCR, as reported (Yang *et al.*, 2004). Using genomic DNA as template, a 1.9 kb *tmpA* 5' fragment was amplified with primers tmpAGSP1 (TATAGTGCCTTACTGGCGGGTAAGGTTCC) and tmpAGSP2 (TGAATCAAATATTGGCCCATACGCGGGGAT) and a 1.9 kb *tmpA*-3' frag-

ment was generated with primers tmpAGSP3 (TTTC CGATG CATCACTTACGCTGTAATGAT) and tmpAGSP4 (TTGAT GATTAGAAAAGACGACGAAGAAGCCC). Using pNF03 as template (Yang *et al.*, 2004), a 2.6 kb GA-5-GFP-*AfpYrG* cassette was amplified with primers tmpAGFP1 (ATCCCCGCGTATGGGCCAATATTT GATTCAGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCC) and tmpAGFP2 (ATCATTACAGCGTAAAGTGTATGCATCGGAAAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGC). These three PCR fragments, purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden), were mixed and subjected to fusion PCR with primers tmpAGSP1 and tmpAGSP4. The final 6.5 kb *tmpA*-GFP-*pyrG* construct was purified with QIAquick gel purification kit (Qiagen, Hilden) and used to electroporate conidia (Sanchez *et al.*, 1998) from strain 11035, which lacks non-homologous recombination and was kindly provided by Berl Oakley and Michael Hynes before publication (T. Nayak *et al.*, submitted).

Transformants with expected genetic integration events were identified by Southern blot analysis. pGS18 KpnI fragment was used as *tmpA*-specific probe, and the XhoI–Apal fragment from pTLO6 was used as *argB*-specific probe. Total RNA isolated with the Trizol reagent (Life Technologies) was fractionated in formaldehyde gels, transferred to Hybond-N-nylon membranes (GE Healthcare, UK), and hybridized using standard techniques.

Strains, media, transformation and growth conditions

Aspergillus nidulans strains used in this work are listed in

Table 1. *Aspergillus nidulans* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
RMS011	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>	Stringer <i>et al.</i> (1991)
TGS6	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, RMS011 transformed with pGS19
BL001	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, tmpA::pDC1, veA1</i>	Sanchez <i>et al.</i> (1998)
CGS5	<i>biA1; ΔargB::trpCΔB; metG1; riboB, trpC801, tmpA::pDC1, veA1</i>	This work, progeny from BL001 × MH1164
CGS12	<i>pabaA1, yA2; brlA::lacZ::argB, veA1</i>	This work, progeny from TJA22 × CLK43
CGS43	<i>pabaA1, yA2; brlA::lacZ::argB, ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from TJA22 × TGS6
TBN68.11	<i>pabaA1, yA2; alcA(p)::ΔN(1–423)fluG::trpC; veA1</i>	T. Adams, USA
CGS47	<i>pabaA1, yA2; alcA(p)::ΔN(1–423)fluG::trpC; ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from TBN68.11 × CGS45
TJA22	<i>biA1; metG1; brlA::lacZ::argB, veA1</i>	Aguirre (1993)
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (2002)
CGS49	<i>pabaA1, yA2; ΔfluG::trpC; veA1</i>	This work, progeny from RBN119 × CLK43
CGS39	<i>pabaA1, yA2; ΔfluG, ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from RBN119 × TGS6
CGS45	<i>biA1; metG1; brlA::lacZ::argB, ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from TJA22 × TGS6
CGS51	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	This work, progeny from RBN119 × TGS6
CGS52	<i>biA1; metG1; ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from RBN119 × TGS6
CGS53	<i>pabaA1, yA2; ΔtmpA::argB, veA1</i>	This work, progeny from RBN119 × TGS6
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center, USA
RBN119	<i>biA1, yA2; ΔfluG, argB2; metG1; veA1</i>	Wieser and Adams (1995)
TJH3.40	<i>biA1; wA3; metG1, stcE::argB; veA1</i>	Butchko <i>et al.</i> (1999)
MH1164	<i>yA1, suadE20, adE20; amdS-Δ223; amdA7; riboB2, veA1</i>	M. Hynes, Australia
11035	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2, ΔnkuA::argB, veA1^a</i>	T. Nayak <i>et al.</i> (submitted)
PW-1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
TTMP–GFP1	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2, tmpA::GFP::pyrG, ΔnkuA::argB, veA1^a</i>	This work, 11035 transformed with <i>tmpA</i> -GFP- <i>AfpYrG</i>
TTMP-RFP1	<i>biA1; argB::alcA::tmpA::mRFP; metG1; veA1</i>	This work, PW-1 transformed with palcA-tmpA-mRFP
TTMP-RFP18	<i>biA1; argB::alcA::tmpA::mRFP; metG1; 3X alcA::tmpA::mRFP; veA1^b</i>	This work, PW-1 transformed with palcA-tmpA-mRFP
TTMP-3HA10	<i>biA1; argB::alcA::tmpA::3HA; metG1; 3X alcA::tmpA::3HA; veA1^c</i>	This work, PW-1 transformed with palcA-tmpA-3HA
TTMP-OvE1	<i>biA1; metG1; alcA::tmpA, veA1^d</i>	This work, PW-1 transformed with palcA-tmpA

a. Partial genotype; it may contain *argB2*.

b. Contains four copies of the *alcA*-*tmpA*-mRFP construct.

c. Contains at least three copies of the *alcA*-*tmpA*-3HA construct.

d. Contains an undetermined number of copies of the *alcA*-*tmpA* construct.

Table 1. All strains were grown in supplemented glucose minimal nitrate medium (Hill and Käfer, 2001) at 37°C. Plasmid pPL1 containing the *riboB* marker (Oakley *et al.*, 1987) was used in co-transformation experiments. To disrupt *tmpA*, strain RMS011 was transformed with linear pGS19 using standard procedures (Yelton *et al.*, 1984). For developmental cultures and nutrient starvation experiments washed conidiospores from 5-day-old plates were used to inoculate liquid cultures at a density of 5×10^5 conidia per ml. To induce conidiation in solid medium, liquid cultures grown for 18 h on a rotary shaker at 300 rpm were filtered and exposed to air as reported (Aguirre, 1993). For nutrient starvation experiments 50 ml cultures were filtered through Miracloth (Calbiochem, Darmstadt), immediately rinsed with prewarmed standard minimal medium or medium lacking glucose or nitrate and mycelia were shifted to the same rinsing media (Skromne *et al.*, 1995). For *fluG* and *tmpA* overexpression experiments, cultures inoculated at 1×10^6 spores per ml were grown for 14 h and then shifted to 100 mM threonine as sole carbon source for 10–20 h (Wieser and Adams, 1995). Two types of experiments were carried out to test extracellular complementation. First, the method of Lee and Adams (1994a) was adapted as follows: wild-type and $\Delta tmpA$ mutant strains were grown on solid medium for 18 h, covered with Isopore http membrane filters having a 0.4 μ m pore size (Millipore, Billerica). After this time, strain TGS6 ($\Delta tmpA$) was point inoculated on top of the membrane and incubation was continued for another 54 h. Second, conidiospores from strains CLK43 or TGS6 were used to inoculate liquid media in plates and grown without shaking for 24 h. At this time, mycelial mats were removed and used media were filtered through Millipore membranes with a pore size of 0.22 μ m (Millipore, Billerica), and inoculated again with conidiospores from strains CLK43 or TGS6. After 45 h the newly developed mycelial mats were observed under a stereoscopic microscope.

β -Galactosidase activity, genetics and microscopy

β -Galactosidase activity was determined as reported (Aguirre, 1993). Crosses were performed using standard genetic techniques (Pontecorvo *et al.*, 1953; Clutterbuck, 1969). Photomicrographs from plates were taken with a Sony DSCF-717 digital camera coupled to a microscope Nikon Eclipse E600 or Nikon SMZ1000. Samples from nutrient starvation and *tmpA* forced expression experiments were fixed and processed for electron scanning microscopy. For GFP microscopy, conidia from strains 11035 and TTMP-GFP1 were germinated on glass coverslips, shifted to MM-glucose medium lacking nitrogen for 3 h and observed fresh. For mRFP microscopy, conidia from strains PW-1 and TTMP-RFP18 were germinated as before, shifted to MM with ethanol as sole carbon source for 4 h, to induce the *alcA* promoter, and observed. Confocal images were obtained with a MCR 1024 Bio-Rad laser scanning system equipped with an Ar Kr/Ar air-cooled laser attached to an inverted Nikon TMD 300 microscope with a Nikon 60X objective. For GFP, samples were excited with a 488 nm laser line at a low power setting (97–99% attenuation), and emitted light was band-passed with a 522–532 nm filter. For mRFP, samples were excited with a 568 nm laser line and emitted light was band-

passed with a 647 nm filter. Images were obtained concurrently by separate photomultiplier channels and were viewed and processed with Todd Clark's program Confocal Assistant 4.02.

Acknowledgements

We are grateful to J. L. Ramos and A. Díaz (IFC-UNAM) for generous help with TmpA modelling, N. Keller, T. Adams, B. Oakley and M. Hynes for very useful strains, and W. Hansberg and D. Gonzalez (IFC-UNAM) for critical reading of the manuscript. We also thank H. Riveros-Rosas for discussion, L. Ongay, G. Códiz and M. Mora from IFC-UNAM Molecular Biology Unit for DNA sequencing/synthesis, and A. Patrón and R. Picaso from IFC-Microscopy Unit for confocal and electron scanning microscopy. G. Soid-Raggi was supported by a scholarship from CONACYT and DGEP-UNAM. This work was supported by Grants 400346-5-25115 N, 2002-C01-1713 from CONACYT and SAGARPA-CONACYT respectively.

References

- Adams, T.H., Boylan, M.T., and Timberlake, W.E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353–362.
- Adams, T.H., Wieser, J.K., and Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35–54.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* **8**: 211–218.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111–118.
- Aramayo, R., and Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J* **12**: 2039–2048.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**: 421–424.
- Bellamacina, C.R. (1996) The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J* **10**: 1257–1269.
- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., and Timberlake, W.E. (1991) Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **19**: 3105–3109.
- Butchko, R.A., Adams, T.H., and Keller, N.P. (1999) *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics* **153**: 715–720.
- Carson, M. (1977) Ribbons. In *Methods in Enzymology*, Vol. 277. Sweet, R.M., and Carter, C.W. (eds). Orlando, FL: Academic Press, pp. 493–505.
- Chen, H., Thomas, M.G., O'Connor, S.E., Hubbard, B.K., Burkart, M.D., and Walsh, C.T. (2001) Aminoacyl-S-enzyme intermediates in beta-hydroxylations and alpha,beta-desaturations of amino acids in peptide antibiotics. *Biochemistry* **40**: 11651–11659.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317–327.

- Conti, E., Franks, N.P., and Brick, P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287–298.
- D'Souza, C.A., Lee, B.N., and Adams, T.H. (2001) Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **158**: 1027–1036.
- Dorn, D.L. (1970) Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **66**: 267–279.
- Dym, O., and Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**: 1712–1728.
- Finking, R., and Marahiel, M.A. (2004) Biosynthesis of non-ribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **58**: 453–488.
- Haas, H. (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 316–330.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., and Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**: 4916–4923.
- Hill, T.W., and Käfer, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newsl* **48**: 20–21.
- Johnstone, I.L., Hughes, S.G., and Clutterbuck, A.J. (1985) Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J* **4**: 1307–1311.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153–1163.
- Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2004) The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* **279**: 7413–7419.
- Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**: 181–189.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**: 1241–1255.
- Lee, B.N., and Adams, T.H. (1994a) The *Aspergillus nidulans* *fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**: 641–651.
- Lee, B.N., and Adams, T.H. (1994b) Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**: 323–334.
- Lee, B.N., and Adams, T.H. (1996) FluG and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *EMBO J* **15**: 299–309.
- Lee, B.N., Kroken, S., Chou, D.Y., Robbertse, B., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2005) Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **4**: 545–555.
- Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. (eds). (1994) *Aspergillus: 50 Years On*. Amsterdam: Elsevier.
- Mirabito, P.M., Adams, T.H., and Timberlake, W.E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859–868.
- Oakley, C.E., Weil, C.F., Kretz, P.L., and Oakley, B.R. (1987) Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **53**: 293–298.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., and Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141–283.
- Prade, R.A., and Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**: 2439–2447.
- Roncal, T., Cordobes, S., Sterner, O., and Ugalde, U. (2002) Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryot Cell* **1**: 823–829.
- Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194–199.
- Sanchez, O., Navarro, R.E., and Aguirre, J. (1998) Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **258**: 89–94.
- Seo, J.A., Guan, Y., and Yu, J.H. (2003) Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**: 1083–1093.
- Shatwell, K.P., Dancis, A., Cross, A.R., Klausner, R.D., and Segal, A.W. (1996) The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J Biol Chem* **271**: 14240–14244.
- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21–28.
- Sridhar-Prasad, G., Kresge, N., Muhlberg, A.B., Shaw, A., Jung, Y.S., Burgess, B.K., and Stout, C.D. (1998) The crystal structure of NADPH: ferredoxin reductase from *Azotobacter vinelandii*. *Protein Sci* **7**: 2541–2549.
- Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C., and Timberlake, W.E. (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* **5**: 1161–1171.
- Timberlake, W.E., and Clutterbuck, A.J. (1994) Genetic regulation of conidiation. In *Aspergillus: 50 Years On*, Vol. 29. Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 383–427.
- Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., et al. (2004) Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY). *Curr Genet* **45**: 383–389.
- Tsitsigiannis, D.I., Zarnowski, R., and Keller, N.P. (2004) The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **279**: 11344–11353.

- Wieser, J., and Adams, T.H. (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**: 491–502.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J., 3rd, and Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62–69.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P., *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359–1362.
- Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1470–1474.
- Yu, J.H., Wieser, J., and Adams, T.H. (1996) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**: 5184–5190.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. TnpA defines a new family of proteins conserved in fungi and plants. The amino acid sequence of TnpA is aligned to small (A) and large (B) hypothetical proteins from fungi or plants. Each sequence is identified by the species name initials followed by GenBank accession or contig numbers and protein size. TnpA homologues with contig numbers were manually deduced from the Fungal Genome Initiative (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/>), *A. fumigatus* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus/; <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>), *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) and *P. chrysosporium* (<http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html>) genome sequencing projects. Asterisks indicate proteins that seem incorrectly annotated and were manually deduced as follow: Mg EAA52257*, contains 57 additional amino acid (aa) at the C-terminus; Nc XP_325028*, includes only the last 509 aa of this protein plus nine additional amino acids at the N-terminus; Fg EA77498* includes only the last 985 aa and I₉₈₅ was replaced by S. Conserved amino acids are darkly shaded. Stars indicate positions corresponding to histidines in ferric reductases (FRE) and NADPH oxidases (NOX) involved in haem ligation, with a filled star indicating the only

histidine conserved in FRE, NOX and TnpA families. A dark dot identifies a histidine conserved in TnpA homologues but absent in the FRE/NOX family. Transmembrane domains predicted by SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) are underlined. Hypothetical FAD (RLHFS) and NAD(P) (GSGIGP) phosphate-binding domains are indicated by top dashed and open boxes respectively. For large TnpA homologues (B), adenylation and peptide arylation (Chen *et al.*, 2001; Finking and Marahiel, 2004) homology regions are underlined with asterisks and small caps (^) respectively. Alignment was obtained with BioEdit using CLUSTALW (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Organism names are: An, *Aspergillus nidulans*; Af, *Aspergillus fumigatus*; Pa, *Podospora anserina*; Fg, *Fusarium graminearum*; Nc, *Neurospora crassa*; Mg, *Magnaporthe grisea*; At, *Arabidopsis thaliana*; Cg, *Chaetomium globosum*; Os, *Oryza sativa*; Cc, *Coprinus cinereus*; Pc, *Phanerochaete chrysosporium*.

Fig. S2. TnpA and NADPH oxidase NOX3 similarities suggest that TnpA is related to the FRE/NOX protein family. TnpA was aligned to NOX3 from *Rattus norvegicus* with MacVector 7.2, using CLUSTALW. Predicted transmembrane domains in NOX3 and TnpA are indicated with thick and thin black lines respectively. Conserved NOX3 histidines involved in haem ligation are indicated by stars, with a filled star showing a histidine conserved in both NOX3 and TnpA. A black dot indicates a histidine absent in NOX3 but present in TnpA and all its homologues. Dashed and open boxes indicate NOX3 residues involved in FAD and NADPH binding respectively.

Fig. S3. TnpA structural model predicts NAD(P) and FAD-binding domains. TnpA last 252 amino acids were aligned to *Azotobacter vinelandii* NADPH: ferredoxin reductase (Sridhar-Prasad *et al.*, 1998) with CLUSTALW. TnpA model was generated from this alignment by the protein structure homology-modelling server SWISS-MODEL at Expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>), using the ProModII program and NADPH:ferredoxin reductase crystal structure as template. The model was displayed using RIBBONS (Carson, 1977). A FAD molecule bound to the template is shown (A). NAD(P) and FAD phosphate-binding consensus sequences in the template (A) and corresponding regions in the TnpA model (B) are indicated in white colour. N and C indicate the amino and carboxy-terminal ends in the displayed portion of both proteins.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

An AAP13095 486 AA	-----	-----	-----	-----	MSQPEEIVT	RPPTAV---	-----	-----	CVPE
Af contig 41 493 AA	-----	-----	-----	-----	MSWSEKSEIS	IPPPAK---	-----	-----	CRSH
Pa contig 892 493 AA	-----	-----	-----	-----	MEDRTV--VV	YGEKDW---	-----	-----	KKDE
Fg EAA77894 483 AA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pa contig 510 626 AA	-----MT	MSSLSTQRH	GLISDLSQNH	AHPGTFIQTL	PODMDIYEFS	DCESDH---	-----	-----	SDDE
Nc XP-327517 593 AA	-----	MASPYN---	---QELKPAE	PTPAHPAQSG	---VFVEVD	DCESED---	-----	-----	ESDE
Mg EAA52257* 588 AA	-----	MSPTDRG-RS	VIWDDFFTR	PLPDI-EDLS	DTEAYYDSE	-SSPDF---	-----	-----	KDLE
At NP-193589 520 AA	MENAS----	TVRFSSCR	GVAFEIKPN-	ANPFVAVTDD	QNRNVNAERE	GTSSRFRLPW	DFMRNAS---	---	KVVPSS-
Nc XP-325028* 518 AA	-----	-----	-----	-----M	ADKPHTSVE	EKPSPA---	-----	-----	GITV
Cg contig 1.1 513 AA	-----	-----	-----	-----	MEQLTTPVK	AGIQTV---	-----	-----	TPAH
Os BAD61224 592 AA	MDGRDELTTK	PIETKFSSCR	GVTTFEPKPS	ASPFIAAAA	AAACPAKPPP	AAPSTGRWIW	LPLSSSRYS	SFSRIIPAKP	-----
Mg EAA50576 685 AA	-----MS	MPPPPRPPYS	GRRNQAVTR	PTTAIPQNGS	STSSFYGSPP	-APPPP---	-----	-----	PPPP

An AAP13095 486 AA	S--PSETS	N-----	IEKCTI	-----	-----	KDVSE	LMLPDEP---	-SFDLEAQT	AR-----R-
Af contig 41 493 AA	SSHPSNVTLV	D-----	VEKEIA	-----	-----	KILAE	KNVSK---	-EVDLEAQQG	AR-----KK
Pa contig 892 493 AA	LIETRIDLSY	E-----	VSP	TDSCLS	-----	SLPSP	LKEK---	-ADLEAQT	PE-----EE
Fg EAA77894 483 AA	-----	-----	MASHGEALAL	QITSSLESSV	NSLPLAMAP	KNEVVLATPK	EIETLPE---	-----	Q
Pa contig 510 626 AA	EVDLPR---Q	PPATAIATP	ROLEDGLAKL	DSTPS-PRVT	IISTPLSLTD	REDEPDC-PV	TLAGLDPGPL	P-----	PK
Nc XP-327517 593 AA	SIRQSNPDLE	SGGTTVANPT	--YAAGSHAS	SSTGL-SDSK	KNNEKSAVRV	RQLVPDIDL	VYHGLDASPL	P-----	PK
Mg EAA52257* 588 AA	EGRMQRCTPS	STSPRLSHEP	LGNNTRCDII	QVSYSTTGH	KDQDESSRRS	RALTIQSIKH	SLYRROSLTP	-----	PK
At NP-193589 520 AA	---IEHMSR	ASSHFCDDP	DNDDEEEKD	DIFYLEEGGI	KEGNEEHNET	EKAMLASSA	SKHSEKPOQ	PI-----	PKK
Nc XP-325028* 518 AA	TIETTTTPND	PNGKFGHTR	QNDVSSTFS	QASAISTST	NSEKPLIVNE	KRLTYQSTCP	TIIVDLEAQT	E-----	DE
Cg contig 1.1 513 AA	TRNTSTASSD	T-----AYT	TDTAYTADTL	YTVDEEKRLH	HASQGSVSSI	DKGKRESYSS	VSDLEAQA	ET-----	DD
Os BAD61224 592 AA	DCGVGRSQSR	ASSHFCDDLV	AGDEEEDDG	SVPDGHDEEM	AVAAAAAADV	EEDDLKGGKP	SVAASAAAAP	AT-----	ARR-
Mg EAA50576 685 AA	PPSIPRALSP	ARPPRVAYRG	YSEAEVVGIL	RSLEDGRRPM	RGADVPKTS	EEDVFPSPQ	STSSSESTLPL	DMDDVELAE	-----

An AAP13095 486 AA	---LISPIR	YTFLLNIYRRL	FTLVFLANIG	VFVYVMVADR	KL-----	LALVNAAAAN	LLACGLARQP	LUVNITFFTV	☆
Af contig 41 493 AA	RHA-FISSIR	YTALDIYRRL	FSLVFLANIA	VFIAMTADR	KL-----	LALVNATAAN	LLACGLARQP	LUVNAIFVIV	-----
Pa contig 892 493 AA	PLRKRLLGFR	YTALNVYRRL	FTLAFIGNLI	PLIILYLRGA	EE-----	LDLVNASAIN	LAVCGLCRQP	LVLNLYLIF	-----
Fg EAA77894 483 AA	RGSEKTRDLK	YRHASTYRKI	FTIIFVANAA	VFIALMVTNS	AT-----	LLS	RDAASAASAN	LMVICLFRQE	EFVNLCEYEA
Pa contig 510 626 AA	KGSRTYRYFR	YNFGSVYRRI	FCLAFLGNLS	ALVVLASKHG	LSSQAERTY	QOASIAVTAN	VLAALLVRNE	HVVNAFFWVF	-----
Nc XP-327517 593 AA	KGNRLYRYLR	WNFGSVYRRI	FCLAFLGNAA	AVLWFIIIRSG	IE-NRPIILNY	QOAAATAVTAN	LLMALVVRNE	HVVNAMFWVF	-----
Mg EAA52257* 588 AA	KGTRVYRYFR	WNFGSVYRRI	FTLAFICNLA	VLVALIGQNI	VG--TNRITY	REASTAASAN	IFVAMILIRNE	HIVNALFTVF	-----
At NP-193589 520 AA	PSRLSIILLD	QGLFTVYKHL	FVLSSLNLVL	ALVLAATGNF	AY-----	AR	NRAALFSIAN	ILALILCRSE	AFLRLVYFIV
Nc XP-325028* 518 AA	YRQKPLGRIR	YAILTIYRRL	FTVAFMGNAI	AFIIMIKGA	AP-----	MDLVNAAAVN	IAVCGLCRQP	LVINALLFLIF	-----
Cg contig 1.1 513 AA	YAKRFGRFR	YTALNVYRRL	FSLAFIGNAI	AFIILMVKGT	AP-----	LDLVNAAAVN	LAVCGLCRHP	LUVNLSLFLIF	-----
Os BAD61224 592 AA	---SRLAVILFD	QGLFTVYKRL	FVLQVALNAA	AVALAASGHF	PY-----	AE	RRAAVFAMGN	ILALILCRSE	AALRVVFWLA
Mg EAA50576 685 AA	KDEEPRRSRS	CKFGKPHQWI	FTAILGNVLI	VLIILALALTE	TG--SYRLTY	QATMNGFTVN	LLFLFLVRND	HVVNAPFYIF	-----

An AAP13095 486 AA	C--SIPRSAP	LWLR--IAK	VYHYGGVHSG	CGVASLIWYL	GFIGEFSRQY	WSGSS----	S	PFSAAPIVLA	YIILVLLLAI
Af contig 41 493 AA	C--SIPRSAP	LRLRR-VAAK	VYHYGGVHSG	CGIASFLWYA	GFVGLMSKEY	WSPAAGAGNA	AFSILPVLVS	YIILALLLAI	-----
Pa contig 892 493 AA	G--SVPRSAP	TTIKR-LACR	IFHLGGVHSG	TGVASLLWYT	GFAGITYYQF	NPATA----	N	PISIAVLALI	YSVFALLLSI
Fg EAA77894 483 AA	V--LVPHSWP	MSIRK-RLAK	VFHYGGFHSG	AGVAATAWYL	AYTILATMEY	AEDKKE---	-YRLVNMITG	WVVVCMFFVI	-----
Pa contig 510 626 AA	ADKAVTKYLP	LRARR-LGAK	IYSYGGVHSG	CAMAATAWYI	AFVLVLLTLEW	TGSDIAEEQG	MVKGYYLVVS	YTIALLVSM	-----
Nc XP-327517 593 AA	G--TWAKVLP	LWART-LSAK	IYSYGGHSG	GAVAATFWYV	IYLVLLTIDF	R-SHOEGPLD	AIRGYIYLVS	YSIITAMLVVM	-----
Mg EAA52257* 588 AA	G--TWPRRFP	LRTRR-LFAK	VYSYGGHSG	CGVAGTLFWY	VEFALLTIDY	QQRDRDQVLH	ALRGYVYLVS	YGTLVMLALI	-----
At NP-193589 520 AA	VKLLGHSEFV	LRIKIAVTAL	LQSLGGHSG	CGVSSVAWLI	YALVLTLDKR	D-----	NTSTAIIVA	STILSLCLT	-----
Nc XP-325028* 518 AA	G--SIPRSAP	IRIRR-LACK	IFHPGGVHSG	TGVASVIWYI	GFAAVFTYNY	TPS-----	VINTVLTFTV	WLVLGFLLSI	-----
Cg contig 1.1 513 AA	G--AVPRSAP	MRLRR-LACK	IFHLGGVHSG	TGVASCVWYI	GFAGLYTYHF	TPS-----	PVNSIAVLALI	YFVALLLAI	-----
Os BAD61224 592 AA	VALLGRPWVP	VVAKTGTAI	LQSLGGVHSG	CGVSSVAWLA	YALVQALRRR	D-----	EMPEPEVAVA	SAILPFLALS	-----
Mg EAA50576 685 AA	G--DQPKVFP	FRVRY-LFAK	YVNVGGIHS	CGVAAALWYL	SYLIILTVEY	RRRDMYLGLT	PARSHVYFFT	YTLILVLFIT	-----

An AAP13095 486 AA	IIVAYPTFRF	KRHDYFELTH	RFSGWLIVAL	FVILLMVFVD	EASAA--EGK	PMGRFLIELP	AFWFLMLVVL	AIHPWLLLR	☆
Af contig 41 493 AA	ILVAHPAFRM	KKHDWFELTH	RFSAWVVVVL	FVILLVLFSG	EASRA--ANQ	PLGTFLHLPL	AFWFLVITVL	AIHPWLLLR	-----
Pa contig 892 493 AA	IVVAHPTIRR	KHHDVFLVH	RFSANWGLLAL	FWVVISLLGT	QEPS-----	-LEKFLNLP	AFWILLLLTA	ATIHPWLLLR	-----
Fg EAA77894 483 AA	LVAAYPTIRR	KFHDHFEAFH	RFAGWVSLLA	FWVHNIVQAR	VTAH--EWNK	SISYALVRSP	NFWCICVTTT	CTIASWSRLR	-----
Pa contig 510 626 AA	LATAWPEFRR	RCHNWFEVGH	RFMGWTAVFL	FWVQVLLTTY	ENSS-----	H	DFGTGLVQSP	NFWMLVVITG	LVVYPWTRLK
Nc XP-327517 593 AA	LIFAHPRVRV	LMHNSFENTH	RFMGWTVIGL	FWAQIMLETA	DSSNRSSPHH	SFGHFLVRNA	AWWMLLFTTL	LIAYPWSRMR	-----
Mg EAA52257* 588 AA	LVEFAHPRVRA	AIHNVFEGTH	RFLGWTVVVL	FWAQITLIVF	DDSP--AMGL	SYGRALVSE	SFVLLLLITL	LVIYPWTRLR	-----
At NP-193589 520 AA	C-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nc XP-325028* 518 AA	IIVAYPTFRM	RLHDYFELTH	RFSANWILVL	FWILLLILGK	QEAN-----	-LGHFLHLPL	AFWITIVLTL	ATIHPWLLLR	-----
Cg contig 1.1 513 AA	IIVVAHPSFRA	KHHDYFELTH	RFSNWAALLAL	FWILLIFLLGA	QEPAG----	-LSAFLHLPL	AFWILLLLTA	ATIHPWLLLR	-----
Os BAD61224 592 AA	CAAAFLVLRH	LHNVFERTH	RFAGWGLAL	LWTFVVLVSAG	YDREARSVVP	LAGAVLAGRE	DIRLAAAITF	FTTLPWLTVR	-----
Mg EAA50576 685 AA	LVFSTPRLRR	ATQDWSQLVH	RFLGWTIILL	TIWITLLVAH	DDR---RFNQ	SYGDALGSP	SFVLLVITF	LIYWPWALMR	-----

An AAP13095 486 AA	KVKVTPPEYLS	PHAVRLHFSH	TTTTFGKGIQ	LSKHPLQDWH	GFATFPDVR	-----	-----	-----	-----
Af contig 41 493 AA	KVSVVGETLS	PHAVRLHMNH	TSTTFGKGIQ	LATHPLQDWH	GFATFPDDP	-----	-----	-----	-----
Pa contig 892 493 AA	KVTVTPEPLS	PHAIRLHFDH	TTVKFGQGIQ	VAKHPLKDWH	SFACFPDRFD	NVK-----	-----	-----	-----
Fg EAA77894 483 AA	RRVVYPEKLS	DHATRLHFYK	RDMMKPFYGLK	ISDKPLTEWH	AFATIPDIE	-----	-----	-----	-----
Pa contig 510 626 AA	LRKVEAEVLS	SHCVKLNFEY	RDVHYGQAVR	LTDSPILRETH	FGFVIPHP--	-----	-----	-----	-----
Nc XP-327517 593 AA	LRNVEAEVLS	PHCVKLNFEY	RDVYFGQAVR	LTDAPLKETH	AFGVIPHP--	-----	-----	-----	-----
Mg EAA52257* 588 AA	RRGVQVELLS	KHCIKLNFSY	RDGHYGOAIR	LSDAPLKDDQ	RDPRLCHHFQ	PQD-----	-----	-----	CSNPDR----
At NP-193589 520 AA	RVPVDVSSLS	GHASLTKFRG	-GLKSGILGR	ISPSPLSEWH	AFGIISDGKT	-----	-----	-----	-----
Nc XP-325028* 518 AA	KIPVKPEPLS	AHAIRLHFSH	TEVVFGQGIS	VAKHPLKDWH	SFACFTDKFD	-----	-----	-----	-----
Cg contig 1.1 513 AA	RVPVKAPELS	PHAVRLHFSH	ATVRFQGGIS	VARHPLGDWH	SFASFTDQFD	-----	-----	-----	-----
Os BAD61224 592 AA	RVPVTVTAPS	THAAILTFQG	-GVRAGLLGR	ISRSPLSEWH	AFGIISDGRR	-----	-----	-----	-----
Mg EAA50576 685 AA	KREVVVEYLS	DNCKIFNFEDY	QDLFEGQOIC	MSDAPLKKT	AFAVLPNPKK	PADPPPIEIM	PTMLRSRNTT	ASNANHHNYS	-----


```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
-----MASSDL LSHLSATDRA LFWKYGVGAE VSVPFQCVHH AFEFHAKSNP QLTAVDELGT TL-----S
-----MSSFSFSS LESLSLADRV LFNKFSKGAE CPIPYDVAHH AFEAVAQHP DLTAVRHYDG ST-----IT
-----MG SQVEPGSLYS LESLSTEDQL LFNRFGRGET IPLPFTRVHH AFEASIQHP GATAVRHFDG TS-----MT
-----MDMTN PMQDDILYDS I-LELGQDC IDTPFSTVTS AFYHHAKKYP DATALRDLTE SP-KE-----LI
-----MM SPLVSPRDGN LFRSFGFGPQ RPVPYPTVHH AFIDCAKQYP DTVAVCDLSW NKSVE---VT
-----MASN -PALSAVDAS LFRRFGRGRR EEPFQCVHH AFEHHARRDP SAVATEHLGH SI-----T
-----MAS PVLAVPOGTA VVPSFTQGTC SQPSFSTITE AFFHYAATQP SVTAARDLSA EPPVE---IS
-----MGSDL LSHLSANDRA LFWYEQGQAK AFVFPQCAHH AFEFHAKANP DLTAVEEFTP KI-----T
-----MSTAH SRFSSERNAD LFOQFGFGPR TQVFFATVHE AFYIHALRAP MDVALLDLGS HSSRE---VT
-----

```

```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
YGELDRRANC LASRLRS-VG VVQGSRVCLM VERAVTLPVA VLGILKAG-- --AAIPLDG NIVSDSTLKH ALVDSGSTVA
YAELDRRANM LANELIHTYG LEIGDRVVLV YSRCIEMVVF IMAVLKAG-- --GQVPLDG GIVTDDTLGF DIADSDAPVV
YGELDRHANI LANELLTRFC FKRGARAVLV YSRTIEMVIF ILAVLKAG-- --GQVPLDG GIPIEIALSH VVSDSADIV
YRELANRAQN LASHLIA-QG VCPDSRIPLV AKRGIDMVG ILAILSCG-- --AQVPLDG GVVPEDETARR VLEESKGGVV
YGKLLQYAEF VALRLQS-HG VVPGSRIVLA TKRSVEMVAG ILGILMCG-- --AQYIPLDG AVVPDETALH AVIQSQNSVA
YGELNRRANA LAHRLRA-MG VRPGARVCLL VQRSIPMVVG IMAILKAG-- --GAVPLDG GIVYDSTLAF VLQNAKCALA
YGELAQQSII LARRLQS-LG VLPGRVPLV VKRQVGMVVG IFSILSCG-- --AQVPLDG GVVADETLRF VLKQTGGKVV
YKELDRQANC LATRLRG-SG VNVGSRVCLL VERSPWLVIQ VLGVLKAG-- --AAIPLDG NIVSDSTLKH AIQDSAPTVI
YGELLRQSOF IAAQLKH-EG VMPGNRVLLL GRRSTEMVAG ILGILMAG-- --AQYIPLDG GVVPDLTVQR AVEQSAATVA
*****

```

```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
LTLRKFHEHRL E-----GAP- VPVVFLDDAI CPSYNPSHC- ---VKPRDTT TSKDSVYIYI TSGTTG----
LCLPKFFEKV VRSV-PDDRR NMVNVDLDS TSPWLKMG-- --NPSNPMVEV NTDGAYVIY TSGTTGRPKG VDVHRHGVTN
LCLPKYSKA T-----EACK QGPAIILSNL SSDIWTSG-- --VASRPNVDV QPEDGAYVIY TSGTTGRPKG VDVTHHGVCN
LCLTSTKHRV E-----SHFG HTVVAIDQVA TPSLEEN-- ---SHID-LA SPETGCVIY TSGTTGPKG VDVTHKNVAN
LCTCTFRSRL H-----SLPQV SSVLVLEDLL AEAETG-IR ASTTPLICEG DENSGCVIY TSGTTGTPKG VDVKHGVTN
LTLTDYAHVR A-----DFP- --HINLDEEM ES--EGADC- ---PDVEDLS SPDDSCYIY TSVVCLAPGN VEM-----
LTSKSTAHRV S-----NTGV SHVVITIEESH --ELDDN-- ---TDFTPFS QPEAGCVIY TS-----G VDVSHRNVN
LTLRKFQHRV A-----DAAS TEIVYLDEL CTSYNPNHC- ---TKPRDFT SSTNSVYIY TSGKTSKE--
VCLQYKERL A---SLGGL SPIILLEDLL CGDMYTR-FV VDEHLLREG DVQETPKAW TLRTRTSPTS SAKNRGIWG-
*****

```

```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
-----TPKG VHVTHGN-----
TLLAEPKLG IRPGRNVAQQ LNVAFDMCAW EILGTMNGG TLIHRGSLQ PWTECLQRCD TIIATPSVAT NRPK-----
SLLVEPAKLE ITVGTKVAQQ LSVAFDMA-- ---TVMNGG TLYIRGSGND LWNELCKQVD VVI STPSVAT KRFPN-----
LVCLSPGDLG VKVGTGCVGSV LNISFDMAAW EIFVICNGG TLVLRGSS-- --WESTLQQID VLICPTILS KYHF-----
VVCHAPGNLG MSRGSRVGQV LSI SFDMGYV TDMHSE-- ---H-----TQSIPPRLP QYPM-----
--APSRVAQL LNI AFDMAAW V-----GLVI DRNA--HTVT
LLCQAPGNLG IGPGTGCVGSV LNV SFDMAAW ETLGCLSNNG TLI LRGSN-- --WSKALKELD VLICPTILS KQKF-----
--WKAVMRN VDI LFPSTP-----SMLA PHNF-----
--YRAARKLV IS-----SQL ASIWDILIC T-----PSILA RYTP-----
*****

```

```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
-----LPNM R-----LPLALML PHS-----
--VEDFPN-----VDTIavg GEP-----
--YEDFPN-----LKTIVVG GEP-----
--AQFPR-----IKTVATA GEP-----
--HRYGRR A-----MLTEVATT QLSV-----
S--MVLQET LGSL-----SNGATLCTR GKS-----SK EWQEVLRKVD IVIGAIADDDH VYSYHTEYNW YESHPKLLGH
--EDYPK-----LKTVATA GEP-----
--ADYPN-----LSTVVVA GEA-----
--DDFPN-----IKRVAT-----ADR WAAS-----A
*****

```

```

An AAP13095 486AA -----
Cc contig 1.177 933AA -----
Fg EAA78607 1026AA -----
Pa contig 1248 1007AA -----
Fg EAA77498* 985AA -----
Af contig 166 989AA -----
Pc scaffold 53.p1 1026AA -----
Fg EAA72692 987AA -----
Cc contig 1.194 943AA -----
An EAA61962 950AA -----
-----
-----MSQP E-----EV IVTREPPTA-- ---VC VPESFS-----
EAWCSC-----LSDV EHLFR--FR CMGKTSKD-- ---WKAVMRS ---VD I-----LFS
--FNVVCG-- --PTEISMLNT CHLHQGPGLP SIGKPNPNTN VYILDDNENP ---VP VQPGVMWAG GPGVSAGYIN
RFLNVCG-- --PTEISVLNT VHVHKLGGPL TIGKPNPNT LYILDEDENP ---VK IGEAGVMWAG GVGVSAGYLN
TYWNCCG-- --PTETIVVNT MHKHTVGKEL SIGRPTPNR VYVLDGEGKP ---TP MGTVMWAG GLGVSAGYIG
TFYNCCG-- --PTEVTIINT MHRHQFGQQL TIGRPLPNTS VYILDDKQLP ---VV IGEVGTWAG GAGITRGLY
LAYS GTTIAR --YHPADYPMI KVLATAGEPC PQRSPTPNN VYILDENLDP ---VP IGPQVMWAG GGGITRGLY
SYFNCYG-- --PTETIVVNT THLHTGQPL SIGKPTPNT VYILDEFKLP ---VP VGEVGNVWAG GAGVARGYVD
KFYNACG-- --PTEVTIANT MQLHTPGDVL TIGGPTPNNS VYVLDENMRP ---VP IGEVGTWAG GAGITRGLY
TFYNCCG-- --PTETIINT MHEHTGQQL TIGKPTPNN VYILDGNKRP ---CR IGPQVMWAG GLGVSAGYIG
*****

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

-----
TPSM----- --LAP---H NPVDYPNVKT VVVGAGECPK DLRPNDIR-- --FL RKVWSNGTLQ HLRGRIDNQVK
LPEL----- --TATRYKL DKFTNDG-- --TMMFNTG-----DL AQWLEDGSL PLGRKDDQVK
LPEL----- --TATRYKL DKFTRDG-- --RMMFNTG-----DL ROWNADGCLE TLGRRDDQVK
LEDK----- --TAERYKP DPFSRDG-- --SLYNTG-----DL GRWLPDGSIE ILGRVDDQVK
QPEK----- --TAERYRY DPFVDDGWA YSH-- --SMMFNTG-----DL ARWLPDGSLE TLGRNDDQVK
LPDK----- --TAERYKL DPFANDG-YN VTERSIVADQ AHRSFMFNTG-----DL GRWRLDGTLE ILGRVDDQVK
LPDK----- --TAERFRP DPFANDG-- --SNMYNTG-----DL CQWNSDGTILH ILGRIDDQVK
LPDK----- --TAERYVP DPFVDDGSM FNTGDLGYVL DSRCVELRNL GS-LCLLERV RRWHSNGTLV HLRGRIDNQVK
KPEK----- --TTERYHY DVFVDD-- --GR----- --SMYNTG-----DL ARWFPNGSLE TLGRNDDQVK
*****
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

VNIKCIKD VSELMIPD-- --VTGATALLID GELWGFVKPS NISPED-IKA AAHKV----- QPYY AVPSKILTM--
IKGFRVELDG VATAMETCAG VIKGCALKIE NALWGFYSSD VQIDENOLKA AVGKS----- QPFY AVPSVWKHL-
IQGFRVELDG VSRSIETTPG VIKGCALKIE NALWGFYSSD VQIDENOLKA AVGKS----- QPFY AVPSVWKHL-
IDGFRVELDG VSRASIESCPD VIKGCALKIE TSLWGFYSAT HPIDQAEHLK AVSAQ----- QPFY GVPKVVWHYLG
VKGFRVELDG VTSASIVSAPG VSQAALLID GEIHGFI TPR N-CDVTTTK HMHQH----- QPYY AVPTHLHAL-
IKGFRVELDG VASASLASC PG VLEAAIMVE GDVVAFTVPO A-LDLQQLQM HLKAR----- LPYY ALPTQVHRV-
IKTCPLVKDA VALLLEGELW G----- --FVTPA DVDVDA-VTE ATKKV----- QPYY AVPTRFWAL-
IKGFRVELDG VVACIKSCPS VQSATALLIN EEIHAFITPS H-CPVPVIEA HLKSL----- QPYY AMPTHYHQL-
IKGFRVELDG VATAMEVSY- -- --L GRVPGD-SVS HSSFL----- FEYR LTF-----
AKGFRVELDG VSACLASSPN VHQATALLVN GELTGFLTPR N-CAIQALHQ SLKAK----- LPYY AIPTRWQTM-
*****
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

-DHFPETA-- -- --NGKTDKRV LQQAIESKE -----EEAK LKEEKAAIPE NVAWISLPPIT VVTAPK--TE
-PVLELTP-- -- --NGKVDKRA LMKIATFEGAL MDSLGLTVAK PRPQTLWPSG DRMMSMTSST DGTIVVG---
-PTIPLTA-- -- --NGKIDKRV LRELATA----- --VN SGSQRTTPPA EVGLLAPSIT DVEKAS---
-DELPSTP-- -- --NGKVDKRV LKVLALTEQS -----TTIQ ACENEKIQES RVBLKFPQS-- MSTLA---
-DEFPLTP-- -- --NGKIDKRA LAQLSRPQK----- --KTS QSDTEMLDEK KHVVNLASRE TVSTRS---
-DELPHAPC CSGNSKLTLI GSNKIDKRA LKAAALAPTS P---VIEEK IVETPSTASS RTEQVSTVDA AFYQOS--LYS
-ETLPMTA-- -- --NGKVDKHA LKMSVMAVS -----TEVR TPLPAVLAHA RMDNSAHSAT SPSKFS--
-LLSDS-- -- --NGKTDKRI LRQMALDAKN -----QEEK P--ANKAPAQ NAAVWNLPTT VLAQAAGAQP
-DEFPLTP-- -- --NGKVDKRS LIQQLTAGD----- --KIY PVLAER--EG SSSSISTPST TITTT--
*****
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

LTIPHRPSDH SLGSTN--TK ISAQVKEADS SASSTSELEK OEYIWSGYQD DDHPEKTQGR LVRNLRHQIF SLYRRLFSV
-----ADNN VMRDLEKDEK PLVDEYNEE FPLPEKNVGH GWRWLRHTAF SAYRKLFGFI
-----VPSS IS SATDEKPPDV APVPPKGFH GWRWLRHRLG SAYRKLFGII
-----TLTD -----KLDLE SGIPDKAMAR PLRGLRRRVE IVYRRLFSLI
-----DSSD -----SLRKP LPLAEKKNRK VVRGLRYRIF IVYRRLFTLI
NDTKQTVSVP SLPPPVIYHD VSISEKILAY EQLP--TLEK TGNEDWGYED DPVDPKTOGK FMRNLRHQVF SLYRRLFGIV
-----DASD TT-----L LPEHQYDLE KALPEKDLPK HARGVRRHLL IVYRRLFSLV
PTIPHRSSER SLVSTVGSTV VGSQVKQVDS SAS--SALEK EEYIWSGYLE DEVPEKTQGR IVRNLRHQIF NLYRRLFSV
-----SSSS -----PQNEP TPLPDKKHGR QWRGLRYRIF IVYRRLFSLV

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

FLANIGVFVY VMVAD----- -RKLALVNA AAANLLACGL ARQPLVVNTI FFTVCSIPRS APLWLRRIAS KVVHYGGVHS
FVNAAILIW ICVKK----- EYDANRIGGI VIANVFIGVL MRQELVINTF FLIFTSIPSS WPLFIRRTAA RVYHGGIHS
FVNTLILILI LLVNSRDNDY YPKPAHVATA VASNLLAAVL VRQEVVNAI FFTCSRVPST FPLSIRRHFA RVYHGGVHS
FVANIAFVV MLWKSRESNF ELPLDNLATA VSNLLASVL LRQDYVVNVV FWLATRMPST APLAIRRHLLA KVVHYGGVHS
GLLNLAAALIC VIALH----- -LDSEWLGII TAINLAVAVL VRQDTNINVL YTIFCSMPKS WPLFARVCA KIVYHGLGHS
WLANVAALC ILFIPK----- -LGPQWISTI AFINLTIAVL VRQDAVINVL YTICCSVPKS WPLAIRRCA KIVYHGLGHS
FVNMAVLVA TFARSG----- GADAQYLGQI VANLFCAIL MRQDYVINAF FTVACAVEIS WPLFIRRTCA RVYHIGG---
GLFNIGAAVA LLLTS----- -INREWMGII TAINLATAVL VRQEFINAL YTICCSVPKS WPLAIRSRA KIVYHGGVHS
FIINMALFIW LLVTK----- DYDAHRLGGI VVANVFIGVL MRQEMVINTL FIIFTAVPPS WPLCIRRVCA RIYTIIGGHS
FMANLAMLIC FLTFS----- -INRRHITTV SFVNTIATVL VRQDMAINML YAVCCSVPTS WPLAIRRCA KIVYHGLGHS

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

GCGVASLIWY LGFIGEFSRQ YWSGSS----- --SPFSAAPI VLAYIILVLL LAIIIVAYPT FRFKRHDYFE
GAGVSSLLWL CLFTAQATKE MINGG----- --KTSVRTV AITYVILAE LGIVIFAYPA LRKRLHDTFE
GCAVSATAWV FMYTISVTRD FLSKEHP----- --AQIKSVVL ALTYIILGFL CFIILGMAWS IRMKMHDQFE
GASVAASLWV LVFTVAATR LAPTGSTQ----- --PSQRIAVL VLTYLIFALL VALLAMAWPS IRAKMHDTFE
GAGVCATAWL VISTVGTIC NAGFCKGH----- --ATVSLATL VVSWILCGLL CSMVATAWPS FRKQYHNFYE
GAAMAATAWV AGSISYNTY QVDDARAL----- --AKASPATL TSLSLVLLLL FGMIGFAYPT FRKKRHNTFE
-----PTKE LLEK----- --KTSVATV AITYFILTLL VSVILFAYPK NRSVHHDFAFE
GAAASAGAWL LATNIADIAC AFGNCPDW----- --GNLSIASQ VISWILSVMF VGMIGMAWPS VRKRYHDQFE
GAGVSFVWL VAFTAQATKE MINKGKVRFH ITFSETFES RLLQTSVRTV AITYVILAE LGLIFAYPA LRKMHDTFE
SAAVMAVAVY TGAICYNINS FVNOPEP----- --LRPSVLT TSLLIACSIF ITMIGLAYPT LRKHHDLFE

```

An AAP13095 486AA
Cc contig 1.177 933AA
Fg EAA78607 1026AA
Pa contig 1248 1007AA
Fg EAA77498* 985AA
Af contig 166 989AA
Pc scaffold 53.p1 1026AA
Fg EAA72692 987AA
Cc contig 1.194 943AA
An EAA61962 950AA

```

LTHRFSGLI VALFVILLMV FVDEASAAEG KPMGRFLIEL PAFWFLMLV LAIHPWLLI RKVKVTPPEYL SPHAVRLHFS
NTHRFLGWSA LALVWVQPMF LTI-DYLPEG QMLGQTLVKI PQFWLVLIIT CSCIWPWFLR RKVDVKEPEVL SNHAVRLWFD
WTHRFGWTS VALVWAHIV ST--AAS-TT GPLGPALAO SPTIWLSSLIT LCIALPWTLL RRVKVVEPEL SKHAVRLHFD
WTHRFGWTA LALVWAHLMV VT--AALPST QPFGAALART PALYLLSLIT LSIAPWMLR RRVKVVAEPL SSHAVRLHFD
RFHRFAGWTS LGLFWARTIL AIN-DSRPOG QDLRLAAVKS PDFWLLIVAT LSIASSWFFL RKVPVVEAEVL SDHAVRLHFD
RTHRFGWTT LGIINQITIL SIR-DQRG-T QPLGRAVISS PNFWMLLVIT ASIASSWFFL RKVPVDAEVL SNHAVRLHFD
KTHRFLGWTA TALVWCQVVL LTN-DYKRPP QTLGNALVRS APFWLVVMT CSIILPWRL RKVNVRSVVM SKHAVQMHPD
RTHRFGWTT LALFWVQVVL SAN-DSTPAG TTLGESCVKS PAFWLLAVAT MSVASSWCFLL RKVPVVEAEKL SDHAI RLHFD
NTHRFLGWTA LALVWVQPMF LTI-DYLPEG QTLGQTLVKS PHFWLVIEFT -----
RVHRFGWVA LVIINQITIS SIR-EQRVSS RSLGHATESE PAFWMLLVIT LSIASSWFL HSPVDAEVL SNHAVRLHFT

```

Soid-Raggi et al. Fig. S1B

An AAP13095 486AA	HTT-----	-----	-TFGKGIQLS	KHPLQDWHGF	ATFPD-VDRD	G--KSFSSLV	SKAGDWTAAAT	IKDQPTHLWK
Cc contig 1.177 933AA	Y-----	-----GVT	FPAGTFMRVS	DAPLKEWHGF	AAIPIPG---	--RTGYSLVV	SRAGDWTSKH	IANPPTKLWV
Fg EAA78607 1026AA	FSTPP-----	-----	PCSSRGVRRIT	DRPLVEWHAF	AAIPEFS---	-GK-GFSIVV	SKAGDWTKRIT	IEKPPTSIWT
Pa contig 1248 1007AA	FKTPR-----	-----	ECSSLGIRIT	DRPLVEWHAF	AAIPEPD---	-NKPGLSILV	SRAGDWTGRM	IDNPPTYLWT
Fg EAA77498* 985AA	YTVP-----	-----	-VNGSFTRLS	RRPLTEWHSE	ATIPNPE-AN	GHAKGYSILV	SNAGDWT RS C	IKNPPSKIWV
Af contig 166 989AA	YTMP-----	-----	-VNGTFTRLS	ERPLLEWHSE	ATVPAPTAVN	GRPKGYSILV	SRAGDWTGRQ	ISKPPPTHLWV
Pc scaffold 53.p1 1026AA	YGLSLIRFPV	GPMLTRHAVT	PKSGHFVRLS	ESPLMEWHGF	ACIPVPN---	--EKGFSILV	SRAGDWTSDK	IANPPSKLWV
Fg EAA72692 987AA	YTVE-----	-----	-VNGSFTRLS	RQPLKEWHSE	ATIPAPEPVN	GRSKGYSILV	SNAGDWTKAT	IQEGPSYIWT
Cc contig 1.194 943AA	-----	-----IT	PDAGTFVRLS	DAPLKEWHGF	ASISIPG---	--RTGYSVVV	SRAGDWTSKH	INDPPTKMVW
An EAA61962 950AA	YTVE-----	-----	-VNGTFTRLS	RRPLLEWHSE	AAVPAPEAVD	GRERGYSILV	SRAGDWTGKQ	IEKPPTRIIV

An AAP13095 486AA	RGVLIYGFAY	AMRVYKRVVV	VTGSGIGGPC	LSFLGDE---	NRPSLRVIWQ	TRAPKRTYGK	EVLNLVGRMD	PNPVIIDTNS
Cc contig 1.177 933AA	KGVPPTYGVLK	LVPMPFRMVI	VATGSGIGPC	APAIFEK---	-RIPMRVLWT	APNVRETFGD	KLVDSSILEAN	PEAVIYDTRK
Fg EAA78607 1026AA	RGTPASGVLA	IAPLFKKIVL	VATGSGIGPC	LPVIMER---	-RVPCVVWS	TKNPLSTYGO	GILDTILACD	PDATIWDTDA
Pa contig 1248 1007AA	RGEPASGVLA	IAPLFKKIVL	VATGSGIGPC	LPVIMER---	-KVPCRILWS	TKNPLRTYGO	GIIDEVKRCD	DRAVIWDTDS
Fg EAA77498* 985AA	RGVPTCGVMR	IATLFNRVVI	IATGSGIGPL	LGHIVKQ---	-SCPTQLIWS	TTRPENTFGK	ELVQVVRDAI	PDAIIWDTKA
Af contig 166 989AA	RGIPTCGVMR	IATLFNRVVL	VGTGSGIGPL	LGHIQVP---	-TCPFRLVWS	TPNPVDTFGR	DVVDAVYAAD	SGAVVHDTRK
Pc scaffold 53.p1 1026AA	RGVPCYGVLR	ITPLFRRVVF	VATGSGIGPC	APCIFEQ---	-RRRIKLLWT	SPDVRQTFGD	EFVDKILAHS	PGAVIYDTRK
Fg EAA72692 987AA	RGVPTCGVMR	IATLFNRVVL	IATGSGIGPV	LGHIQNP---	-SCPTQLIWS	TKNPEETFGE	EICQTISKNI	PGAVIHDTKK
Cc contig 1.194 943AA	KGVPPTYGVLK	LVPMPFRMVL	VATGSGIGPC	APAILRR---	-QIPMRVLWT	APNVRETFGD	NLCNSILEAC	PDAVIYDTRK
An EAA61962 950AA	RGIPTSGVMR	ISPLFTRLVL	LGTGSGIGPL	LGHIQSPGLR	HRCVRIIWS	TPSPVSTFGQ	EIVNAVYAAD	AGAVVHDTKV

An AAP13095 486AA	SGRLDMVPVI	RQIAREHDAE	AICVISNPFV	TKKVVELES	MGIPAYGPIF	DS
Cc contig 1.177 933AA	HGKPDVMKLT	LRLVKEFNAE	AVAIISNQPL	TEKVYVGMS	RGIPAFGAIW	DS
Fg EAA78607 1026AA	KGRPDMVKLA	YQAYKESGAE	CVCIISNRSV	TAKVVYGLES	RGIPAYGPIL	DS
Pa contig 1248 1007AA	MGRPDMVHLA	WELYHESGAE	CVCI V SNART	TKRVVYQLEA	RRIPAFGPIW	DS
Fg EAA77498* 985AA	QGRPDLVRMG	YNVAKNFDAE	AVIIIANEKI	TKKVYVGLET	RGMPAFGAIW	DS
Af contig 166 989AA	QGRPDLVRLT	WDAVQGFQAE	AVIVISNEKL	TKKVYVGMET	RGVPAFGAIW	DS
Pc scaffold 53.p1 1026AA	HGKPDVMKLT	YRLVKEFNAE	AVCIISNQKL	TQKVYVGMTS	RGIPAFGAIW	DS
Fg EAA72692 987AA	LGRPDLVKMG	YNLVKSFKAE	AVIIIANEKI	TKKIVYGLET	RGVPAFGAIW	DS
Cc contig 1.194 943AA	HGKPDVMKLV	LR-LKEFDAE	AVAIISNQPL	TEKVYVGCMS	RGIPAFGAIW	DS
An EAA61962 950AA	LGRPELVKIC	WDAVQEFKAE	GIVVISNEKV	TKKVYVGMS	RGVAAYGAIW	DS

R. norvegicus NOX3 1 MPTCWILNES---VSFVVALLWLAINIYL 26
A. nidulans TmpA 1 MSQPEEVIVTRPPTAVCVPEPSETSFVNIIEKCIKDVSE 40

R. norvegicus NOX3 27 FID---TFCWYAEEESFFYTRVILGSA~~AWARAS---~~AV 59
A. nidulans TmpA 41 LMLPDEPSFDLEAQSTARRLISPIRYTFLNIYRRLFTLVF 80

R. norvegicus NOX3 60 CLNFCMLILLPVS~~SRNFVSLV~~RGTSVCCR--GPWRRQLDK 97
A. nidulans TmpA 81 LANIGVFVYVMVAD~~RKLLALVNAAAANLL~~ACGLARQPLVV 120

R. norvegicus NOX3 98 NLK[☆]FHKL[☆]VAYGIAVNSVIHIVAHLFNLERYHLGQAKDAEG 137
A. nidulans TmpA 121 NTIFFTVCSIPRSAPLWLRRIASKV----YHYGGVHSGCG 156

R. norvegicus NOX3 138 LLAALS~~KLGNAPNESYLN~~PVRTLYTGTTQLLMTVSGITG 177
A. nidulans TmpA 157 VASLIWYLGFIG----EFSRQHWSGSS-SPFSAAPIVLA 190

R. norvegicus NOX3 178 LVISLALILIMTSSTEFIRQSSYELFWY~~THHIFIFL~~FISL 217
A. nidulans TmpA 191 YIILVLLLAIIIVAYPTFRFKRHDYFEL~~THRFSGWL~~IVAL 230

R. norvegicus NOX3 218 AIHGGGRIIRGQTPESLRLHNVTFCRDHFDEWQEAASCPV 257
A. nidulans TmpA 231 FVI-----LMLVFVDEASAAEGKPM 250

R. norvegicus NOX3 258 PQFSGKEPSAWKWTLGPVVLYACEIIRFW~~RSHQEV~~VITK 297
A. nidulans TmpA 251 GRFLIELPAFWFLML-----VVLAIHPWLLLRKVKVTP 284

R. norvegicus NOX3 298 VVSHPSAVLELHM~~KKRDFKMAP~~GQYIFIQCPSISPLEWHP 337
A. nidulans TmpA 285 EYLSPHAVR-LHFSHTTTTFGKG----IQLSKHPLQDWHG 319

R. norvegicus NOX3 338 FTLTSAPQED--FFSVHIRASGDWTEALLKAFGAEGQAPS 375
A. nidulans TmpA 320 FATFPD~~VDRD~~GKSFSSLVSKAGDWTAATIKDQ-----PT 353

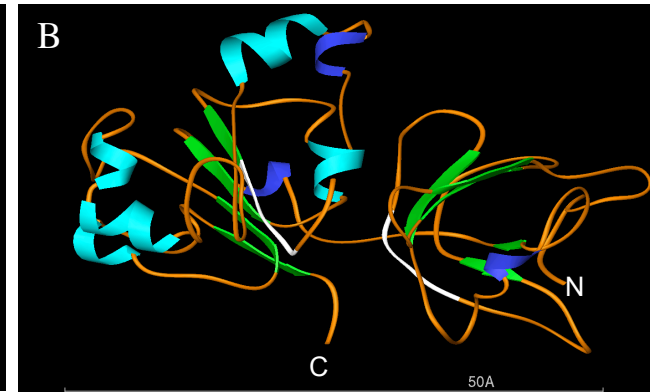
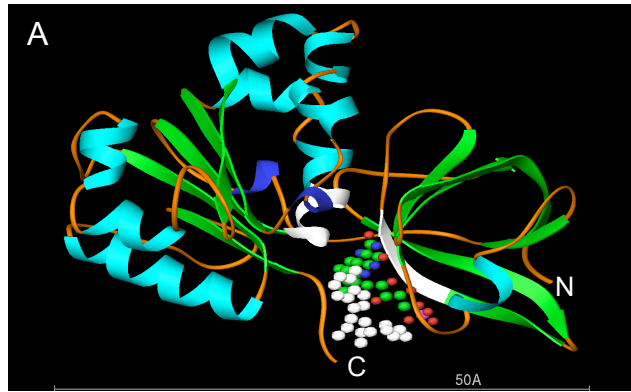
R. norvegicus NOX3 376 ELC~~SMPRLAV~~DGPF~~GGSLADVFHY~~PVSVCIATGIGVTPFA 415
A. nidulans TmpA 354 HLWKRGLIY----GFAYAMRVYKRVVVVTTGSGIGPCL 388

R. norvegicus NOX3 416 SLLK~~SVWYKCC~~ESQSLPGLSKVYFYWICRDA~~AAFEWFADL~~ 455
A. nidulans TmpA 389 SFLG-----DENR--P---SLRVIWQTR--APKRTY~~GKE~~ 415

R. norvegicus NOX3 456 LLSLETQMSEQGKAHLLSYHIYLTGWDEYQAIHIALHWDE 495
A. nidulans TmpA 416 VLNLVGRMDPNP-----V 428

R. norvegicus NOX3 496 SLDVITGLKQKTFYGRPNWNEEFKQIAYNH~~PPSSS~~IGVFFC 535
A. nidulans TmpA 429 IIDTNS-----SGRLDMVPVIRQIAREHDAEAI~~CVISN~~ 461

R. norvegicus NOX3 536 GPKAMS~~KT~~LQKMCRLYSSSDPRGVHFY~~YNKENF~~ 568
A. nidulans TmpA 462 -PFVTKKVVVELESMG--IPAYGPIFDS 486



Cap. 2. IV. RESULTADOS

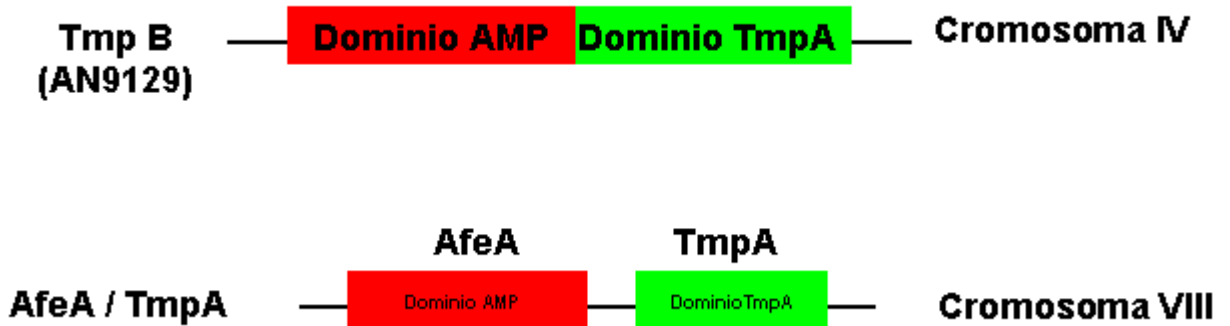
El gen *afeA* se encuentra contiguo al gen *tmpA* y presenta un dominio de unión a AMP

La interrupción del gen *tmpA* provoca un fenotipo algodonoso o *fluffy*, el cual se caracteriza por mostrar un retraso en la esporulación asexual (Soid-Raggi *et al.*, 2006). La proteína TmpA define una nueva familia de proteínas presentes en los hongos filamentosos y en las plantas. El análisis tipo blast indica que hay dos grupos de homólogos de TmpA. Uno incluye a TmpA y a otras proteínas con un tamaño entre 483 y 685 residuos. El otro incluye proteínas de mayor tamaño, entre 933 y 1026 residuos. Las proteínas de este grupo son similares a TmpA en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, en el extremo amino terminal poseen un dominio de unión a AMP (PROSITE PS00455). En estas proteínas el dominio de unión a AMP es del tipo de las péptido sintetasas no ribosomales. La proteína AN9129 (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) de *A. nidulans* pertenece a este grupo y la hemos denominado TmpB. El dominio de unión a AMP está presente en todos los miembros de la superfamilia de las enzimas formadoras de adenilato. El nombre más correcto y específico de esta superfamilia es el de acilo-AMP transferasas, sin embargo a lo largo de este trabajo utilizaré el término de enzimas formadoras de adenilato debido a que en las bases de datos se utiliza este nombre. En esta superfamilia se incluye, además de las péptido sintetasas no ribosomales, a las **cumarato ligasas (4CL)**, a las **proteínas tipo cumarato ligasas (4CL-Lk)**, a las acetil-coA sintetasas, a las acil-coA sintetasas de ácidos grasos y a las luciferasas.

El gen *tmpA* se encontró al complementar una mutante algodonosa con un fragmento de restricción *EcoRV* de 13.8 kpb (Figura 1, Soid-Raggi *et al.*, 2006). Este

fragmento se encuentra en el contig 1.3 dentro del supercontig 1, en la secuencia genómica de *A. nidulans*. Dentro de ese fragmento, a 2283 pb de distancia, se encuentra otro marco de lectura abierto de 583 residuos en orientación inversa. A esta proteína la hemos llamado AfeA (Fig. 6.) (Gen Bank AAP13094, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este polipéptido tiene una masa aproximada de 64 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6.25. El polipéptido que se deduce del gen es idéntico a la proteína hipotética AN0054.2 de *A. nidulans* del Broad Institute <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>. El análisis tipo Blast de la proteína en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> indica que también tiene un dominio de unión a AMP (PROSITE PS00455). La secuencia consenso de este motivo es [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-X-[PASLIVM]-[KR] (Hofmann *et al.*, 1999). Dado que esta proteína forma parte de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato, decidimos nombrar al gen correspondiente *afeA* de *adenylate forming enzyme A*. La similitud entre TmpA y TmpB y el arreglo genético AfeA-TmpA nos sugirió una posible relación funcional entre estos genes. Por lo tanto, estos dos factores: la cercanía de *afeA* a *ttmpA* (Fig. 1, Soid-Raggi *et al.*, 2006) y la presencia del dominio de unión a AMP en AfeA (Fig. 6) nos motivó a analizar la función de AfeA mediante su interrupción.

A



B

<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	1	-----MSTAH	SRFSSE	RNAD	LFQQFG	-FGP	RTQVPF	FATVH	-----	EAFI	YHALRA	PMDVAL	LDLS
<i>AfeA</i>	1	MGLWESSLAR	PQYGD	NANEQ	VYD	LLTFCF	RGPV	PYDEEQ	PLFIDAEAPS	RAFSARQFRI	LVRTLITGLK		
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	75	AQIKHEGVMP	GNRV	LLGRR	STEMVAGI	LG	ILMAGAQY	IP	MDGGV	VVDLIT	VQRAVEQSA	TVAV	CLQQYK
<i>AfeA</i>	91	PAFFSVLGA	GGVFM	GSNAR	SQPQ	LEHLV	SLAEPKII	IT	NREALPTVLN	VSTSKGMLPS	QVCL	LDDAAT	
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	161	-----L	LCG	DMYTR	FV	VDE	DHLLRE	----	-----	GDVQ	QETPKAWTLR	TRTSPTSSAK	NRGIWGYRAA
<i>AfeA</i>	181	SYLNFAQL	LCG	YGENDW	ITFN	DEMI	AKSTPA	AMFSTSG	TGG	LPKAAVLSHH	AIVCQHLTIS	YDVPYAVRRL	
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	236	P-----	SILAR	YTPDD	FPN	--	--	IKRVATAD	RWAASAT	FYN	CCGPTETTII	NTMHEHTTGM	QLTI
<i>AfeA</i>	271	YGQPLY	VLSR	FEISR	FVA	AV	YQYQ	ITETYM	VPAMIHA	FN	CTLPLADYFG	SLR	YGVVAGAPIDGASMQQF
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	317	TIWAGGL	GVS	RGYI	GKPEKT	TER	YHYDFV	FV	DDGR	SVMYNT	G-----	-----	---DLARWFF
<i>AfeA</i>	361	VVFQNR	YEP	-GNAAS	IGRL	QPGY	EIRLVG	ADGN	LVADDN	KPGELYVRGP	GLLTCYRGRD	DAK	D
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	377	QVKAK	GFRVE	LDG	VSA	CLAS	SPNV	HQA	----	----	-----	-----	-----
<i>AfeA</i>	450	LIKVR	GWQVA	PAELES	LLK	H	PGIED	AAVT	GVT	SKDGSTE	VPRAFVVR	SK	TL
<i>tmpB</i> (dominio de adenilacion)	403	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>AfeA</i>	540	SGKIQR	FKLT	QMNTY	REIVS	SLLAR	FRGAS	LQSVG	IMHGG	RIAV	403	583	

Figura 6. El gen *afeA* se encuentra contiguo al gen *tmpA* y las proteínas TmpA, AfeA y TmpB poseen dominios en común. A) Muestra el arreglo de TmpB, AfeA y TmpA en el genoma de *A. nidulans*. B) Muestra un alineamiento tipo ClustalW (Blosum 62) del dominio de adenilación de TmpB con la proteína AfeA.

El gen *afeA* presenta dos intrones

Los genes de las proteínas 4CL y 4CL-Lk en *Arabidopsis thaliana* tienen de tres a cinco intrones en una posición que se conserva (Schneider *et al.*, 2005). Una excepción es el gen *At1g62940* que presenta cinco intrones, dos hacia el extremo 5' que no se conservan y tres hacia el extremo 3' que se conservan. El hecho de que la posición de algunos de estos intrones se conserve en todos los genes de esta

subfamilia indica que estos genes se relacionan filogenéticamente.

Nosotros identificamos el gen *afeA* a partir de la secuencia del fragmento *EcoRV* de 13.8 kpb que complementó la mutante *tmpA* (Soid-Raggi *et al.*, 2006). Para conocer a AfeA y la ubicación y el número de intrones, se analizó la secuencia de *afeA* con el programa: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>. Este programa solamente indicó la presencia de un intrón. Para comprobar la ubicación de este intrón se obtuvo el mRNA total y se diseñaron dos oligonucleótidos. De esta forma, mediante el método 3' RACE, se obtuvo el cDNA, el cual se secuenció parcialmente. Encontramos que *afeA* presenta dos intrones: uno hacia el extremo 5' y el otro hacia el extremo 3' (Fig. 7). Ambos intrones tienen la secuencia característica consenso AG/GT (Breathnach y Chambon, 1981). El segundo intrón coincide con el segundo o tercer intrón de todos los genes que codifican para las 4CL-Lk y para la 4CL tres (4CL-3) de *A. thaliana*.

```

1  agccct gact aat t at t cgacgaact cat gagaat ggt ct gt gggagt cgt cctt agcagcagcct cagt at ggt gacaat gccaat gaggcgt at acacc
   | cggagct gat t aat aagct gct t gact act ct t acccagacacct cagcagggat cgt ggt ggaat cat accact gt t accgt t act cgt ccat at gt gg
   | M G L W E S S L A R P Q Y G D N A N E Q V Y T
103 gacct gt t gacct t ct gct t cccggccct ct gcat acgat gaagaacagcct t gt t at t gacgcagaagccccc cgcgacct t cagt ccccggcaa
   | cggacaact gaaagacgaagcccccgggacacgt at gct act t ct t gt cgt aacaaat aact gctt ct t cggagagcact cggaaat caccggccgt t
   | D L L T F C F R G P V P Y D E E Q P L F I D A E A P S R A F S A R Q
205 t t cagat cct cgt cccgacct cat t accggaact gaaagcccat cat gt gcaaaagggcgt t gt ct gct ggt ccaat t ggggaacaat gt aagt t gact
   | aagct cct aggagcagcct ggaagt aat gccc gact t t cgggt agt acacgt t t cccgct aacacagcagcaggt gaaccct t gt t a cat t caact cga
   | F R I L V R T L I T G L K A H H V Q R G D C V L V H L G N N
307 aagaggt act aacct gct cgcacaaccggcgt gt t t cgagaagcaca t ccaagcggcct cgt cccggcct t cct cgt gl acat ct t cat t at t
   | t t ct ccat gat t gggacggagcgt t gggcgct acaaaagct ct t cgt t aaggt gggccggagcagccggaaagggagacat gt agaaagt aat aa
409 t t t gct cgt ct t t cccct t t agt at gt t gat ggt gaccggt t t t cccgt gcaagt cat at acccgcgact gt t t t cagct aat t ggt cccg
   | aacgagct agagaaggggaaat cat acaact accgact ggct caaaaaggccacct t t agt at t gggcgt gacaanaagt ccat t aaccagcgc
   | I I Y P A L F F S V I G A G
511 cggct gt t t ggaat cgaat gcacggat cagct cagaaact cagcagcct cgt t t cgt t agt gacccaagat t at cat t acgaat cccgaagcct
   | cccgacaat accct agct t accg cct cgt cggagt cct t gact cgt ggaacaaagcaat cgaat cgt t t ct aat agt aat gct t accgt t cgcga
   | G V F M G S N A R S Q P Q E L E H L V S L A E P K I I I T N R E A L
613 accgacagt cct caat ct ct ccaagaagcagcgt gct ccccagcgaat gt gct act gacgat cgcgaacagaacacat t gat caact agt cagat c
   | ggt ct cagagt t acagagt t t cgt t cccct acgagggat cgt t caccagat gacct gct accgct t gt ct t gt ct aat agt t gat cagct ag
   | P T V L N V S T S K G M L P S Q V C L L D D A A T E H I D Q L V G S
715 cggcagcagcct cct t gat agt gaagt gagaact at ct gaat t t cgcgagct cct cgt t accgcaagaacgact ggt t acgt t t aacgat gaat
   | accgt ct cccgact gaaact at cact ct act ct agct agact t aagcgcct cgaagcacaat cccct ct t gct gact aat gcaat t gct act t a
   | G T A P Y L D S G D E S Y L N F A Q L L G Y G E N D W I T F N D E M
817 gat ccaaaat ct acccggccagct t ct ccaactt ggcacggaagcct accaaaagccgggt at t at cccacacgcaat t gt gt gccaaacct
   | ct accgt t t cagat gt cccgagcct acaagagt ggt caccgt gccc cccgt gat t t cggcccat aat accgt gat gct t aacacagct t gt gga
   | I A K S T P A A M F S T S G T G G L P K A A V L S H H A I V C Q H L
919 caccat t t cct acgat gt gacct at cgggt t cgt cgt t aat gt cgt gccat gt t ccat ct t t t ggt gct ct at ggaagcacaat t t cccagc cgggt a
   | gt ggt aagagt gct acagggat agcgaagcagct aat t acagcagcgggt acaaggt agaaaacacagat accat gct gt aaaaaggt cagggcat
   | T I S Y D V P Y A V R R L M S L P M F H L F G A L W T H I F P V R Y
1021 t gggcagcct at accg cct t t cccgt t t gagat t agcgggt t cgt cgcagct gt gt at cgt accaaat cagggagacat acat ggt accgccaat
   | accgt cgt cggct at gcagaaagggcaaaact ct aat cgcgaagcagct cgcacat agt cat ggt t t agt gct ct gt at accat gggcgt act a
   | G Q P L Y V L S R F E I S R F V A A V Y Q Y Q I T E T Y M V P A M I
1123 ccat gct t t t aat cgt gcaact gcaact cgggat t at t t cggat cctt acgat at gt cggcgt cgcgcgcgcgcaat t gacggggcgt caat gcagea
   | ggt agcaaat t agcagct gt gacgt gacgcct aat aagcct agggat gcat acagcgcagcggcggcgggt t aact ccccgact t acgt cgt
   | H A F N R C T L P L A D Y F G S L R Y V G V A G A P I D G A S M Q Q
1225 at t cccggaat t cct cccgt cgcagcagcagcct ct cagct ct gggcct gacagagt aggagt agt t t t ccaaat cgt accggaagcgaagaacgc
   | aagcgt t aagcagcagcagct cggcgt cgcgagat cgcagacccct act ct ccat cct cat caaaagt t t t agcct ggcgct cgt cct t t gcg
   | F R E F L P L D A D A S Q L W G M T E V G V V F Q N R Y G E P G N A
1327 agct agt at t ggcagact ccaact ggaat acgaaat cgcct t gt cgcgct gat ggt aacct ggt cgcgagcacaat aagcct gggagct gt at gt gcg
   | t gat cat aacct ct gagg cggact at gct t t agcggaaacagcgcgact acat t ggaccagcct gct gt t at t cggacct cgaat acagc
   | A S I G R L Q P G Y E I R L V G A D G N L V A D D N K P G E L Y V R
1429 cgt cccggct t gct t acat gct accgggagcggat gacccaagat t cacaggt t ggt t cgcact ggagact gcat at gt aacgat gact at a
   | gccagggcgaacgat gt acat ggccct gccct act cggct t t t aagt gt cccaacaaagcgt gacct ct gacct at acat t t gct acct gat at
   | G P G L L T C Y R G R D D A K D S Q G W F R T G D V A Y V N D G L Y
1531 t t acat t t ggcgaacaaagcact t at caaat t cagat ggcaccccccgact t cat agt at gt t aacct t t act aacagcaat t gcaat gca
   | aat gt aacaaccct t ggt t cct cgaat aat t t caagct cc cagcgt ggggggt gaagt at gcat acaat gt gaaat gat t gt ct t aacct t accgt
   | Y I V G R T K E L I K V R G
35
1633 ggt ccccccgaagact cgaat cgt cct cct caaacat cct gaaat t gaggat cccgctt gacggcgt aact t cgaagacggcagcagaggt t cc
   | cccagcggcct ct t gact t agct agagagat t t agcagct t aact cct accgcccact cccgcat t gaagct t t cccgt cgt gt ct ccaag
   | V A P A E L E S I L L K H P G I E D A A V T G V T S K D G S T E V P
1735 cccgccc t cgt cgt cagat caaagacgt gt cggagcgcgct gacct cgcagaaat ct acct ct t ct gt ccccgcaat t agct t cct acaaaagcct
   | ggcggaagcagcagct agt t t cgcagacccct cgcgagact gaaagct cct t cagat ggaagacagcggcgt t aat cgaagat gt t t cggaa
   | R A F V V R S K T L S G A R L T S Q E V Y L F C R R Q L A S Y K A L
1837 t gat ggaagct t at ct t t cgaagat cccact accgcaagcgaagaat ccaagcct t caagct cact cagat gaacacat accggaagat t gt t ag
   | act acct cgt aat agaaacagct t ct ct aggt gat cggct t cggcct t ct agt cgcgaat t cagat gat ct act t gt at gacct ct acaat c
   | D G G I I F V E E I P R T A S G K I O R F K L T O M N T Y R E I V S
1939 t t ct ct gct t gct cgt t t cccgcccagct ct acagacgt ggaat t at gcat gaaagcgt at t cccgt at gat agcagct ggt t t cgt cat t t cca
   | aagagacagcagcgaagcgaagcggcggcct cagat gt ct cgcacct t aat acgt acct cccgcat aacggcat act at gct cgcacaaaagcagat aagat
   | S L L A R F R G A S L Q S V G I M H G G R I A V
2041 gt at gaat t t accgcccagcagct gat t t gacaanaact t gt t caact t ggaat t
   | cat act t aat gct cggcgt gct gact aact gt t t t gaacaagt t gaacct caa

```

Figura 7. Secuencia genómica del gen *afeA* y de la proteína correspondiente. En azul se indica los exones de la secuencia del DNA genómico y en anaranjado se indican los dos intrones detectados. La secuencia subrayada corresponde al DNA que se secuenció.

El gen *afeA* codifica para una enzima 4CL-Lk

Las enzimas que presentan un dominio de unión a AMP son de muy diversos tipos. Todas se caracterizan porque activan ácidos carboxílicos que se requieren en numerosas vías metabólicas. Estas enzimas participan en la síntesis o en la degradación de diversos ácidos grasos, aminoácidos y metabolitos secundarios. A pesar de su diversidad estructural, todas estas enzimas utilizan ATP en un mecanismo de dos pasos. El primer paso se caracteriza porque en presencia de ATP forman un intermediario de adenilato, el acilo-AMP, y se libera pirofosfato:

Resultados

Table with 4 columns: Accession, Gene, Protein, and Score. Rows include At1g20480 and At1g20510.

KGVMLT

Sequence alignment table for KGVMLT domain. Columns include accession, gene, protein, and score. Rows range from 37 to 118.

Sequence alignment table for a domain (likely K211). Columns include accession, gene, protein, and score. Rows range from 115 to 171.

BOX I K211

Sequence alignment table for BOX I K211 domain. Columns include accession, gene, protein, and score. Rows range from 168 to 254.

293

Sequence alignment table for a domain (likely K211). Columns include accession, gene, protein, and score. Rows range from 252 to 270.

Ao BAE62962 589 AA	275	RYGQPLYILP	REFLIAQYVAA	VYQYQITFAN	VVPAMIHAFN	R--CAFPVAD	YIQSLRYGVV	AGAPIDGASM	QQFOELLHVD	ANASGLWGMT	362
At 4CL-LK At3g21230 AAP03020	279	RTGAALLIVP	RRELNLVVEL	IQRKYVTVVP	VAPPVVLAFI	K--SPETERY	DLSSVRIMLS	GAATLKKLEL	DAVRLKFP-N	AIFGQSYGMT	365
At 4CL4 Q9LU36 570 AA	279	RTGAALLIVP	RRELNLVVEL	IQRKYVTVVP	VAPPVVLAFI	K--SPETERY	DLSSVRIMLS	GAATLKKLEL	DAVRLKFP-N	AIFGQSYGMT	365
At 4CL3 Q9S777 561 AA	274	RSATVLLMH	KFEIGALLDL	IQRHRTVIAA	LVPPVLIALA	K--NPTVNSY	DLSSVRFLVS	GAAPLKKLEL	DSLRRRFLP-Q	AIFGQSYGMT	360
Le BAA08366 585 AA	292	RAGAVLLIMQ	KFEIGALLDL	IQRHRTVIAA	VVPPVLIALA	K--NPMVDKY	DLSSIRVVLS	GAAPLGRLEL	LALLNRVP-H	AIFGQSYGMT	378
Sa NP_825041 524 AA	236	RLGATVVVLP	RELDLFTLAA	IKKHRIITLY	VAPPVVLAFI	K--HPAVAQY	DLSSLKVTIS	AAAPLDAITA	AACSRRLG-V	PPVGCAYGMT	322
Gm 4CL3 AAC97500 570 AA	276	RAGAVLLIMQ	KFEIGALLDL	IQRHRTVIAA	VVPPVLIALA	K--NPMVADF	DLSSIRVVLS	GAAPLKKLEL	EALNRNVP-Q	AVLGCYGMT	362
Pt AAC24504 570 AA	277	RAGAVLLIMQ	KFEIGALLDL	IQRHRTVIAA	VVPPVLIALA	K--NPLEANE	DLSSIRVVLS	GAAPLKKLEL	DALESRFPV-Q	AIFGQSYGMT	363
At 4CL1 Q42524 561 AA	271	RVGAAILIMP	KFEINLLEL	IQRCKVTIAP	VVPPVLIALA	K--SSETEKY	DLSSIRVVKV	GAAPLKKLEL	DAVNAKFP-N	AKLGCYGMT	357
At 4CL2 Q9S725 556 AA	264	RIGATILIMP	KFEITLLELQ	IQRCKVTIAP	VVPPVLIALA	K--SPETEKY	DLSSVRMVKV	GAAPLKKLEL	DAISAKFP-N	AKLGCYGMT	350
Pto AAL56850 536 AA	247	RVGASILIMP	KFEITGLLELQ	IKKYKVSIAF	VVPPVMLATA	R--SPDLDKH	DLSSLRMTKS	GGAPLKKLEL	DTVRAKFP-Q	ARLGCYGMT	333
Pt X Pd 4CL1 AAC39366 557 AA	252	RVGASILIMP	KFEIVTLMEL	VQKYKVTIAP	FVPPVVLATA	K--CPVVDKY	DLSSIRVTKV	GAAPLKKLEL	DTVRAKFP-N	AKLGCYGMT	338
Nt 4CL1 Q24145 547 AA	255	RVGAAILIMP	KFEIAPFLEL	IQRKYVSIQF	FVPPVVLATA	K--SPIVDSY	DLSSVRVTKV	GAAPLKKLEL	DAVRTKFP-N	AKLGCYGMT	341
St AAD40664 545 AA	253	RVGAAILIMP	KFEIAPFLEL	IPKHVVTIAP	FVPPVVLATA	K--SPLVHNY	DLSSVRVTKV	GAAPLKKLEL	DAVRTKFP-N	AKLGCYGMT	339
Pc 4CL1 P14912 544 AA	251	RAGVITLIMP	KFEIVPFLEL	IQRKYVSIQF	FVPPVVLATA	K--SPVVDKY	DLSSVRVTKV	GAAPLKKLEL	DAVRTKFP-N	AKLGCYGMT	337
Vp O24540 553 AA	259	RAGSILIMP	KFEIVPFLEL	IQRKYVSIQF	FVPPVVLATA	K--STVVDNY	DLSSVRVTKV	GAAPLKKLEL	DAVRTKFP-N	AKLGCYGMT	345
At 4CL-LK At419010 NP_193636	274	SLGRTIVVMK	REDDASDVNV	IERFKITHEF	VVPPVLMALT	KKAKGVCGEV	-FKSLKQVSS	GAAPLSRKFV	EDFLQTLF-P	VDLIQSYGMT	361
At At4g05160 NP_192425 544 AA	257	QRGNALVSMR	RRELELVLRN	IEKFKVTHLV	VVPPVFLALS	K--QSIIVKFF	DLSSLKTYGS	GAAPLKKLEL	EECGRNLN-N	VLLMGSYGMT	343
At At5g63380 NP_201143 562 AA	271	SLGRTIVVMK	RRELELVLRN	IEKFKVTHLV	VVPPVFLALS	K--QSIIVKFF	DLSSLKTYGS	GAAPLKKLEL	EECGRNLN-N	VLLMGSYGMT	343
At At5g38120 NP_198628 550 AA	264	ALGTTVILIP	RELDGEMMAA	VEKPYVHTLI	VVPPVVLATA	K--SPLVHNY	DLSSVRVTKV	GAAPLKKLEL	DAVRTKFP-N	AKLGCYGMT	357
At At1g20480 NP_173472 565 AA	276	ALGWTIVVLP	KEDMAKLLSA	VETHRSSYLS	LVPPVIVVAV	NGANEISKY	DLSSLHTVVA	GGAPLSRFTV	EKFFVENFP-K	VKLLQSYGMT	364
At At1g20510 AAP3021 546 AA	255	AYGRTIIVLS	KFEMHEMMSA	IGKYQATSLR	LVPPVILVAN	NGADQIKAKY	DLSSMHTVLC	GGAPLSKEVT	EGFAEKYFP-T	VKLLQSYGMT	343

BOX II

Pt X Pd AAC39366 557 AA	339	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TERTVDNDGW	LHTGDIGYID	427
Nt O24145 547 AA	342	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TERTVDNDGW	LHTGDIGYID	427
Af XP_753401 592 AA	365	EVGVVFNQRY	GEQGN----	PGSIRLLPQ	YEVRLVGGQ	GNVVQGESRP	GEIYVRGSGV	LMSYKGRNDA	K-----DAYG	FRTGDVAVYQ	444
An AfeA AAP13094 583 AA	358	EVGVVFNQRY	GEQGN----	PGSIRLLPQ	YEVRLVGGQ	GNVVQGESRP	GEIYVRGSGV	LMSYKGRNDA	K-----DAYG	FRTGDVAVYQ	444
Ao BAE62962 589 AA	363	EVGVVFNQRY	GEQGN----	PGSIRLLPQ	YEVRLVGGQ	GNVVQGESRP	GEIYVRGSGV	LMSYKGRNDA	K-----DAYG	FRTGDVAVYQ	444
At 4CL-LK At3g21230 AAP03020	366	ESG-TVAKSL	AFAPKPFKTK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	453
At 4CL4 Q9LU36 570 AA	366	ESG-TVAKSL	AFAPKPFKTK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	453
At 4CL3 Q9S777 561 AA	361	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	449
Le BAA08366 585 AA	379	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	467
Sa NP_825041 524 AA	323	ELSPGTHVVP	LVNAVNP---	PGTVKLVVAG	TEMRLISLDD	PDQDLFVGEA	GEIARLGPQV	MKGYLGRPEA	TAMIDSEGW	LHTGDVGRVD	409
Gm 4CL3 AAC97500 570 AA	363	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	451
Pt AAC24504 570 AA	364	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	452
At 4CL1 Q42524 561 AA	358	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	446
At 4CL2 Q9S725 556 AA	351	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	439
Pto AAL56850 536 AA	334	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	422
Pt X Pd 4CL1 AAC39366 557 AA	339	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TERTVDNDGW	LHTGDIGYID	427
Nt 4CL1 Q24145 547 AA	342	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TERTVDNDGW	LHTGDIGYID	430
St AAD40664 545 AA	340	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	428
Pc 4CL1 P14912 544 AA	338	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	426
Vp O24540 553 AA	346	EAGPVLMSCL	AFAKEPPEIK	SGAGCTVVRN	AEMKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	434
At 4CL-LK At419010 NP_193636	362	ESTAVGTRGF	NSEKLV---	YSSVGLAPN	MQAKVQVDSV	SGSFLPPGQR	GEIWRGQPNV	MKGYLNDPEA	TQMSIVEDSW	LHTGDVAVYQ	447
At At4g05160 NP_192425 544 AA	344	ETCGIVSVED	PRLGL---	RSQSAGMLAP	YAGVIVSVV	TKGSQPPNQK	GEIWRGQPNV	MKGYLNDPEA	TKETIDKKSQ	VHTGDIGYFN	429
At At5g63380 NP_201143 562 AA	358	ESGGAASSTF	GPEEM---	VKYGAVRLLSC	MEAKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	443
At At5g38120 NP_198628 550 AA	353	ESNGAGASIE	SVEES---	YQSVRLLSCG	VEAKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	435
At At1g20480 NP_173472 565 AA	365	ESTAAASMF	NKEET---	KRYGASLLAPN	VEKIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	450
At At1g20510 AAP3021 546 AA	344	ESTGIGASTD	TVEES---	RYGATKLLSAS	MEGRIVDPP	TGRSLPRNQP	GEICIRGSDI	MKGYLNDPEA	TARTIDKEGW	LHTGDIGYID	429

BOX L

Pt X Pd AAC39366 557 AA	428	GDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	513
Nt O24145 547 AA	431	EDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Af XP_753401 592 AA	444	-NGYFIVGR	TKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
An AfeA AAP13094 583 AA	437	-DGLYIVGR	TKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Ao BAE62962 589 AA	442	-NGLYIVGR	TKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
At 4CL-LK At3g21230 AAP03020	454	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
At 4CL4 Q9LU36 570 AA	454	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
At 4CL3 Q9S777 561 AA	450	EDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Le BAA08366 585 AA	468	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Sa NP_825041 524 AA	410	ADGWLFIIVDR	VKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	496
Gm 4CL3 AAC97500 570 AA	452	EDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Pt AAC24504 570 AA	453	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
At 4CL1 Q42524 561 AA	447	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
At 4CL2 Q9S725 556 AA	440	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Pto AAL56850 536 AA	423	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
Pt X Pd 4CL1 AAC39366 557 AA	428	GDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	513
Nt 4CL1 Q24145 547 AA	431	EDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	516
St AAD40664 545 AA	429	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	514
Pc 4CL1 P14912 544 AA	425	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	512
Vp O24540 553 AA	435	DDDELFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	520
At 4CL-LK At419010 NP_193636	448	EDGYLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	533
At At4g05160 NP_192425 544 AA	430	EDGNYLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	515
At At5g63380 NP_201143 562 AA	444	SEDFLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	529
At At5g38120 NP_198628 550 AA	436	NDGFLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	521
At At1g20480 NP_173472 565 AA	451	GDGFLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	536
At At1g20510 AAP3021 546 AA	430	EDGFLFIIVDR	LKELIKYKGF	QVAPAELEAM	LIAHPDISDC	AVVPMKDEA	AGEVPIAFVW	RAN---GSKI	TEDEIKQYIS	KQVIFYKRIS	515

K540

Pt X Pd AAC39366 557 AA	513	-RVFFTEAIP	KAPSGKILRK	DLRARLATGD	FLIKFQHDY	MQKQK----	-----	557
Nt O24145 547 AA	516	-RVFFTEAIP	KAPSGKILRK	DLRARLAAG	VPN-----	-----	-----	547
Af XP_753401 592 AA	524	GGIVFVEEIP	RTASGKIQR	KLSQNTMYRD	MVSSLLARFK	GAASGLGLG	LHVHGRVAV	592
An AfeA AAP13094 583 AA	527	GGIIFVEEIP	RTASGKIQR	KLTQNTMYRE	IVSSLLARFK	GAS--LQSVG	IMHGRIAV	583
Ao BAE62962 589 AA	532	GGIIFVEEIP	RTASGKIQR	KLTQNTMYRE	IVSSLLARFK	GTSG-LQTVG	LLHQGRIV	589
At 4CL-LK At3g21230 AAP03020	539	-MVFFIEVIP	KAVSGKILRK	DLRARLATGD	FLIKFQHDY	MQKQK----	-----	570
At 4CL4 Q9LU36 570 AA	539	-MVFFIEVIP	KAVSGKILRK	DLRARLATGD	FLIKFQHDY	MQKQK----	-----	570

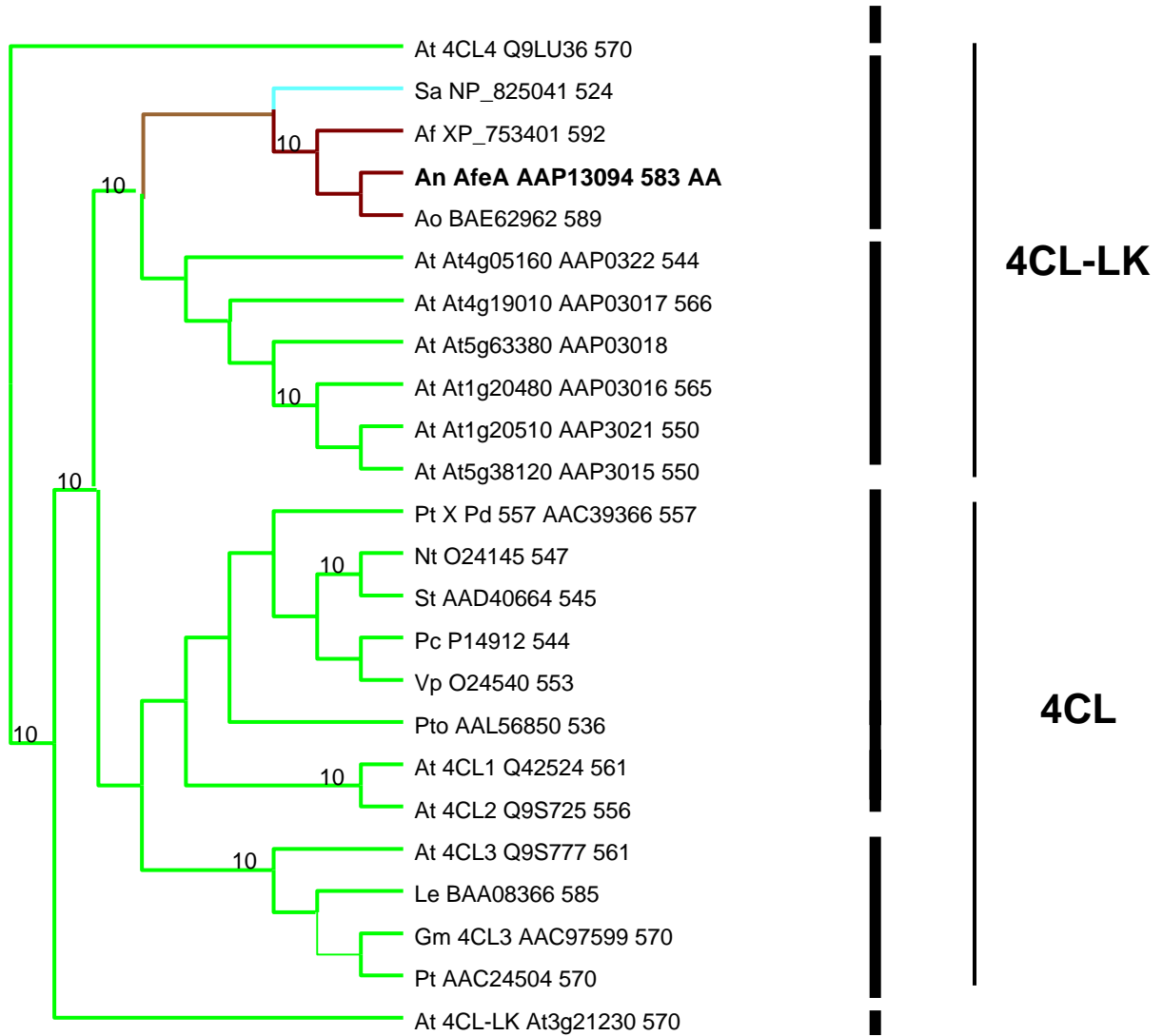
At 4CL3 Q9S777 561 AA	535	-KVFVVASIP	KSPSGILRK	DLKALIC---	-----	-----	561
Le BAA08366 585 AA	554	-KVFVHHSIP	KSPSGILRK	DLRALAAAA	SS-----	-----	585
Sa NP_825041 524 AA	496	-HVTFLDEVP	KAASGILRK	QLRDLEHES-	-----	-----	524
Gm 4CL3 AAC97500 570 AA	537	-KVFVHAIP	KSPSGILRK	DLRALLEATA	TQTP-----	-----	570
Pt AAC24504 570 AA	538	-KVFVHHSIP	KSASGILRK	DLRALATAT	TMS-----	-----	570
At 4CL1 Q42524 561 AA	532	-KVFVTSIP	KAPSGILRK	DLRALLANGL	-----	-----	561
At 4CL2 Q9S725 556 AA	525	-KVFVDSIP	KAPSGILRK	DLRALMNG	MN-----	-----	556
Pto AAL56850 536 AA	508	-RVFFTEAIP	KAPSGILRK	NLKERLPGI-	-----	-----	536
Pt X Pd 4CL1 AAC39366 557 AA	513	-RVFFTEAIP	KAPSGILRK	DLRALATGD	FLIKFQHDY	MQKQQ----	557
Nt 4CL1 O24145 547 AA	516	-RVFFVETVP	KSPSGILRK	DLRALAAG-	VPN-----	-----	547
St AAD40664 545 AA	514	-RVFFVETVP	KSPSGILRK	DLRALAAG-	ISN-----	-----	545
Pc 4CL1 P14912 544 AA	512	-RVFFVDAIP	KSPSGILRK	DLRALASGD	LPK-----	-----	544
Vp O24540 553 AA	520	-RVFFVEAIP	KAPSGILRK	DLRALAAAA	LPTN-----	-----	553
At 4CL-LK At419010 NP_193636	533	-KVVVNSIP	KSPSGILRK	ELKRLLTNSV	SRKL-----	-----	566
At At4g05160 NP_192425 544 AA	515	-RVSFISLVP	KSASGILRK	ELVQOVR-	---KM-----	-----	544
At At5g63380 NP_201143 562 AA	529	-RVAFINAIIP	KNPAGILRK	ELTKIIVDGN	ASKL-----	-----	562
At At5g38120 NP_198628 550 AA	521	-RVAFIDSIP	KTPSGILRK	DLIKFAIS-	---KT-----	-----	550
At At1g20480 NP_173472 565 AA	536	-KVTFLASIP	KNPSGILRK	ELTKLTT-	---SKL-----	-----	565
At At1g20510 AAP3021 546 AA	515	-RVAFVSSIP	KNPSGILRK	DLKIATSN-	---SKL-----	-----	546

Figura 8. AfeA es un miembro de la superfamilia de las enzimas formadoras de adenilato. Alineamiento tipo ClustalW (Blosum 62) con proteínas de plantas y hongos del género *Aspergilli*. Los aminoácidos importantes (ver texto) se indican en color naranja o encerrados en cuadros (ver texto). Los dominios conservados se indican con barras. El dominio de unión a AMP se encuentra entre corchetes anaranjados. Las regiones que comprenden los dominios de unión al sustrato, sbd I y sbd II, se encuentran entre corchetes color azul o marrón, respectivamente. Las secuencias tripeptídicas de localización peroxisomal se indican en color lila. Los nombres de los organismos son: At, *Arabidopsis thaliana*; Sa, *Streptomyces avermitilis*; Af, *Aspergillus fumigatus*; An, *Aspergillus nidulans*; Ao, *Aspergillus oryzae*; Pb X Pd, híbrido entre *Populus balsamifera* y *Populus deltoides*; Nt, *Nicotiana tabacum*; St, *Solanum tuberosum*; Pc, *Petroselinum crispum*; Vp, *Vanilla planifolia*; Pto, *Populus tomentosa*; Le, *Lithospermum erythrorhizon*; Gm, *Glycine max*; Pt, *Populus tremuloides*.

En el alineamiento que se muestra en la Figura 8 se observa una gran similitud a lo largo de las secuencias. Se observa además, un alto grado de identidad y de similitud en el dominio de unión a AMP que se conserva en todas las proteínas. En el análisis filogenético derivado de este alineamiento (Fig. 9 A) se aprecia que los hongos forman un grupo separado de las plantas. Esto sugiere que estas proteínas se derivaron de un ancestro anterior a la divergencia entre las plantas y los hongos. Se observa también que AfeA se parece más a proteínas similares, de función desconocida, presentes en otros *Aspergilli* (proteínas ortólogas) que a los homólogos del mismo *A. nidulans* (proteínas parálogas). Específicamente, AfeA se parece a una proteína de *Aspergillus oryzae*, una especie que se usa mucho en la fermentación de la comida oriental y bebidas alcohólicas, y a una proteína de *Aspergillus fumigatus*, un patógeno oportunista de humanos. La identidad con la proteína de *A. oryzae* (número de acceso BAE62962) y de *A. fumigatus* (no. de acceso XP_753401) es de 78% y 72%, respectivamente (Fig. 9 A y B). El análisis en la Figura 9 A también muestra que AfeA se parece a las 4CL y a las 4CL-Lk de *A. thaliana*. Estas últimas forman un grupo diferente de las 4CL de otras plantas. Los genes de los miembros del grupo de las 4CL-Lk de *A. thaliana* son: *At4g19010*, *At4g05160*, *At5g63380*, *At1g20480*, *Atg20510*, *At5g38120*, *At1g20490* y *At1g20500* (estos dos últimos no se muestran en las Figuras

8 y 9 A). Sin embargo, como se observa en las Figuras 8 y 9 A hay otro gen que codifica para una 4CL-Lk, que se nombra *At13g21230*, que se encuentra separada de las 4CL-Lk y las 4CL. Específicamente AfeA muestra mayor identidad con la proteína 4CL-Lk que codifica el gen *At4g05160* de *A. thaliana*, con un 31% de identidad (Fig. 9 A). En un análisis filogenético de todas las proteínas de la familia de enzimas formadoras de adenilato de *A. thaliana* esta proteína junto con las otras 4CL-Lk se encuentra dentro del clado V (Shockey *et al.*, 2003). Todas estas muestran similitud a las 4CL verdaderas, las cuales se encuentran dentro del clado IV (Shockey *et al.*, 2003). Del clado IV, *afeA* se parece más a *At3g21230* (dato no mostrado). A los miembros del clado V se les llamó 4CL-Lk ya que presentan algunas variaciones con respecto a las 4CL. Estas ocho proteínas tienen en el extremo carboxilo terminal una secuencia tipo I para la localización peroxisomal (Fig. 9 A). Sin embargo, AfeA carece de una secuencia de localización peroxisomal tipo I. AfeA y sus homólogos tampoco tienen la secuencia tipo II de localización peroxisomal (PST2). Esta secuencia es XXRLX₅HL y se localiza cerca del extremo amino terminal o en la parte interna de las proteínas (Subramani *et al.*, 2000). Otras proteínas como las 4CL o proteínas de otros clados también carecen de secuencias peroxisomales. En un árbol filogenético exclusivo de las 4CL y 4CL-Lk de *A. thaliana*, existen 6 clados: A, B, C, D, E y F (Schneider *et al.*, 2003). En este análisis, las proteínas más parecidas a AfeA de *A. thaliana* se encuentran dentro del clado B.

A



B

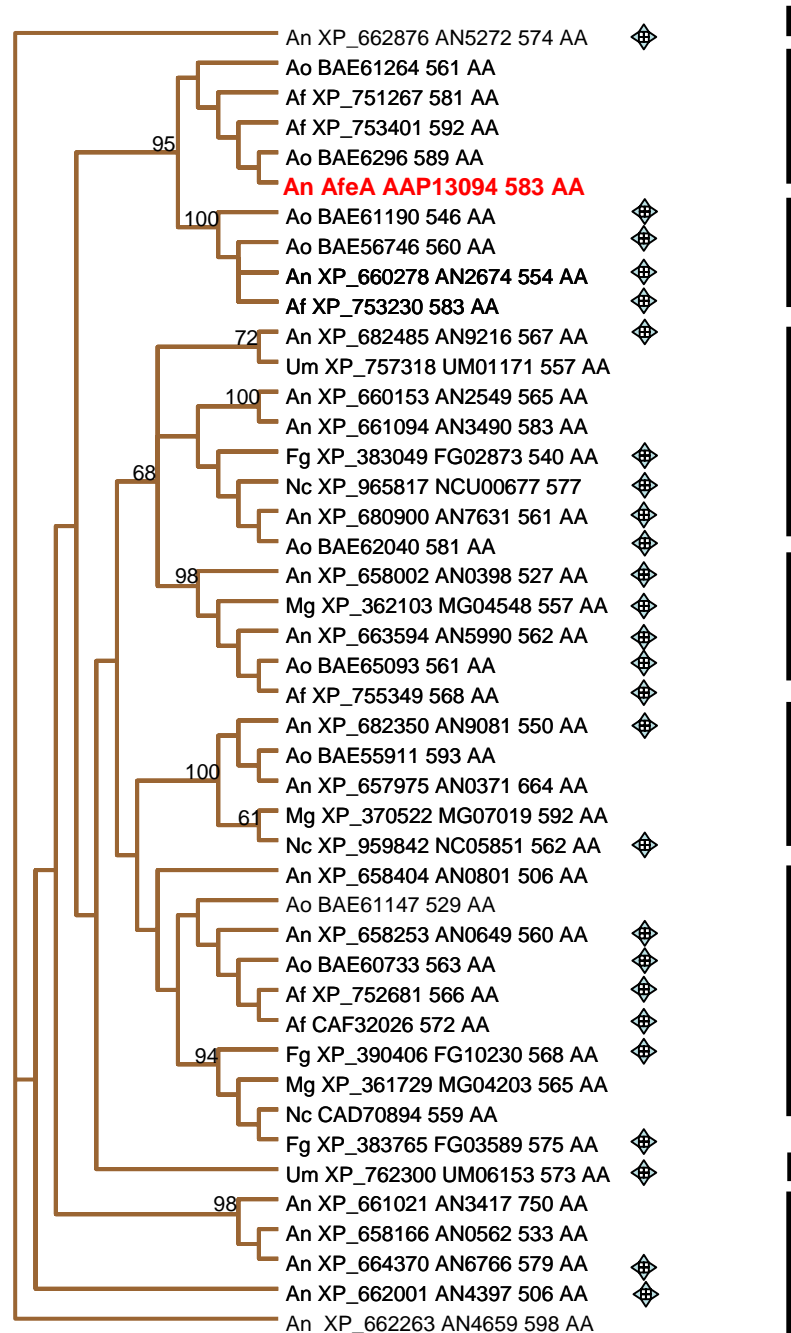


Figura 9. Análisis filogenético de la familia de AfeA. Los homólogos de AfeA se alinearon con ClustalW (blosom 30) y el programa MacVector 7.2. El árbol se generó con el método de neighbor joining. Los números en los nodos son los porcentajes de 2000 repeticiones de "bootstrap" con una corrección tipo Poisson. Las proteínas se indican con el número de acceso GenBank y el número de aminoácidos. (A) Incluye a proteínas presentes en plantas y a algunos *Aspergilli*. 4CL son las cumarato ligasas y 4CL-Lk son las proteínas tipo cumarato ligasas. B) Incluye sólo las proteínas de los hongos. Los símbolos de la derecha corresponden a las proteínas que tienen señal de localización peroxisomal. Los nombres de los organismos son: At, *Arabidopsis thaliana*; Sa, *Streptomyces avermitilis*; Af, *Aspergillus fumigatus*; An, *Aspergillus nidulans*; Ao, *Aspergillus oryzae*; Pb X Pd, híbrido entre *Populus balsamifera* y *Populus deltoides*; Nt, *Nicotiana tabacum*; St, *Solanum tuberosum*; Pc, *Petroselinum crispum*; Vp, *Vanilla planifolia*; Pto, *Populus tomentosa*; Le, *Lithospermum erythrorhizon*; Gm, *Glycine max*; Pt, *Populus tremuloides*; Um *Ustilago maydis*; Fg, *Fusarium graminearum*; Nc, *Neurospora crassa*; Mg, *Magnaporthe grisea*.

Específicamente, en *A. nidulans* hay 17 proteínas de función desconocida, que son similares a AfeA (Fig.9 B). Estas proteínas tienen una identidad entre el 37% y el 28% de sus aminoácidos. La más parecida es AN2674, sin embargo AN2674 tiene una secuencia tipo I para el transporte al peroxisoma (PTS1). Además de SKL existen otras secuencias peroxisomales PST1 como son: SRL, SKM, SKI, ARM, CH etc (Schneider *et al.*, 2005; Subramani *et al.*, 2000). Estas secuencias cumplen con la secuencia consenso de las proteínas peroxisomales que es [S/C/A] [K/R/H] [L] (Gould, *et al.*, 1989; Hettema *et al.*, 1999). Otras proteínas similares a AfeA que tienen esta secuencia blanco son: AN0398, AN2674, AN0649, AN5990, AN4397, AN5272, AN6766, AN7631, AN9081 y AN9216. Las proteínas similares a AfeA que no parecen ser peroxisomales son: AN0562, AN0371, AN2549, AN3417, AN3490, AN4659 AN0801. En el análisis que se muestra en la Figura 9 B se observa que AfeA se agrupa junto con proteínas de otros *Aspergilli*, que como AfeA, carecen de secuencias de localización peroxisomal. Paralelamente, hay otro grupo muy cercano de estos *Aspergilli*, muy parecidos a AfeA, que sí presentan secuencias de localización peroxisomal. Otras proteínas semejantes a AfeA que presentan o carecen de secuencias peroxisomales se encuentran distribuidas en los diferentes clados.

El motivo PROSITE PS00455, presente en AfeA, es rico en glicina, serina y treonina. Se parece al motivo Walker tipo A o asa P GXXXXGK[S/T] que se encuentra en muchas proteínas de unión a ATP o GTP. En este asa se propone que la lisina (K^{211}) de las 4CL y de las 4CL-Lk interactúa con el fosfato γ del ATP (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990). Por lo tanto esta lisina es importante en la catálisis, pero no para la unión de AMP, como se pensaba previamente (Stuible *et al.*, 2000). Esta lisina está presente en todas las 4CL y 4CL-Lk de *A. thaliana* y otras plantas (Fig. 8). En AfeA y en algunos de sus homólogos también está presente, pero no en AN0801, AN3417, AN3490, AN0371 y AN7631. En las 4CL se ha propuesto que hay una cavidad que participa en la especificidad del sustrato que une (Stuible y Kombrink, 2001; Ehltling *et al.*, 2001). En las 4CL esta cavidad está flanqueado por dos motivos muy conservados, la caja I y la caja II. La caja I incluye el motivo PROSITE PS00455, pero es más específico. La caja I (BOX I) y la caja II (BOX II) incluyen las secuencias conservadas SSGTTGLPKG V y GEIRCIG, respectivamente. Como se observa en la

Figura 8, estas secuencias están estrictamente conservadas en las 4CL conocidas de plantas. En AfeA y en sus homólogos más cercanos de los hongos, como en *A. fumigatus* y *A. oryzae*, esta secuencia consenso presenta algunas diferencias. Sin embargo cumplen con la secuencia consenso del PROSITE PS00455. Otros miembros de la superfamilia de las enzimas formadoras de adenilato también presentan las cajas I y II, pero con algunas variaciones. Las 4CL también tienen otros dos dominios adyacentes entre sí, los dominios sbdl y sbdII. Su nombre proviene de *substrate binding domain*, ya que participan en el reconocimiento del sustrato. Estos dos dominios constan de aproximadamente 70 aminoácidos. En la 4CL dos (4CL-2) de *A. thaliana* los dominios sbdl y sbII se encuentran entre el ácido glutámico 276 (E²⁷⁶) y la tirosina 413 (Y⁴¹³). En esta proteína el sbdl comienza en el ácido glutámico 276 y termina en la glutamina 345 (Q³⁴⁵). El sbdII comienza en la glicina 346 (G³⁴⁶) y termina en la Y⁴¹³, siete residuos después de la caja II GEICIRG. En AfeA esta región se encuentra muy conservada, sin embargo, tiene algunas diferencias en los residuos de la región sbdl y sbdII. Una de las diferencias más significativas se localiza aproximadamente 45 residuos antes de la caja II, lo cual sugiere que AfeA utiliza sustratos diferentes a las 4CL (Fig 8). Otro residuo que define la especificidad por el sustrato es el que se encuentra en la posición 293 (Ehltling *et al.*, 2001). En la 4CL-2 de *A. thaliana* en esta posición se encuentra una metionina (M²⁹³), mientras que la 4CL uno (4CL-1) y la 4CL-3 presentan una prolina o una alanina (P o A) en esta posición. En AfeA y en sus homólogos más parecidos se encuentra el residuo aromático tirosina (Y²⁹³) (Fig 8).

Además de las cajas I y II, hay otros residuos conservados en todas las enzimas formadoras de adenilato. Uno es la arginina 449 (R⁴⁴⁹), otros son las lisinas 455, 457 (K⁴⁵⁵, la K⁴⁵⁷) y finalmente la lisina 541 (K⁵⁴¹) hacia el extremo carboxilo terminal (Stuible *et al.*, 2000). Como se observa en la Figura 8, la R⁴⁴⁹ es invariante en las 4CL y 4CL-Lk. Se encuentra en todos los homólogos de AfeA en *A. nidulans*, a excepción de AN0371. Esta arginina también está conservada en la superfamilia y es muy importante para la actividad y afinidad para el sustrato. Desempeña un papel más importante que la K²¹¹ de la caja I. Extrapolando con las NRPs, la R⁴⁴⁹ se localiza en una asa flexible y funciona en cooperación con la K²¹¹ de la caja I para la liberación del pirofosfato durante la formación del adenilato (Conti *et al.*, 1997). La K⁴⁵⁵ se conserva

en las 4CL, en casi todas las 4CL-Lk y en las luciferasas, pero no se conserva en las acilo-CoA sintetasas bacterianas y de levaduras. La proteína AfeA la presenta, así como varios de sus homólogos, a excepción de AN609, AN4201, AN4659, AN0371, AN4397, AN5272 y AN5833. Sin embargo, todas las 4CL verdaderas y las 4CL-Lk presentan la K⁴⁵⁵. En las 4CL y las luciferasas además de estar presente la K⁴⁵⁵, también está presente las K⁴⁵⁷. Esta lisina también es importante para la actividad y para la liberación del sustrato. Se encuentra en casi todas las 4CL y las 4CL-Lk. Sin embargo, AfeA y sus homólogos más parecidos en *A. fumigatus* y *A. oryzae*, así como *At1g20480* de *A. thaliana* (no. de acceso AAP3016) carecen de ella (Fig. 8). En los homólogos de AfeA esta lisina está presente en AN0398, AN0801, AN2549, AN3490, AN0649, AN5990, AN7631, AN9081 y AN9216. Finalmente, la lisina 541 todas la tienen a excepción de AN0801. Esta lisina es imprescindible para la actividad, ya que es el sitio activo de la adenilación. Está estrictamente conservada entre todos los miembros de la superfamilia.

A pesar de que hay similitudes notables entre la AfeA y las enzimas 4CL y 4CL-Lk también hay algunas diferencias importantes (Varbanova *et al.*, 2003). Por ejemplo, la presencia de secuencias relativamente largas que no tienen similitud con otras proteínas en las regiones de unión del sustrato. De tal forma que las cajas I y II se circundan por regiones de baja o nula similitud. Otro rasgo importante es que la caja II no está totalmente conservada en las CL-Lk y 4CL. El residuo más conservado en la superfamilia en la caja II es el ácido glutámico 401 (E⁴⁰¹) (Fig 8). Este residuo está presente en casi todas las 4CL y 4CL-Lk (Fig 8). En AfeA y en sus homólogos también lo tienen, a excepción de AN0562, AN0371 y AN5833. Sin embargo, el E⁴⁰¹ no es indispensable para la catálisis (Stuible *et al.*, 2000). La cisteína 403 (C⁴⁰³) de la caja II varía en algunos miembros de la superfamilia, pero está muy conservada en las 4CL verdaderas (Fig 8). Esta cisteína tampoco es indispensable para la catálisis. AfeA y la mayoría de sus homólogos en los hongos, así como las proteínas hipotéticas 4CL-Lk de *A. thaliana* no tienen esta cisteína, con excepción de *At3g21230* (GenBank AAP03020). Antes de la caja II, hay otras tres cisteínas muy conservadas en las proteínas que unen AMP (Allina *et al.*, 1998). Todas estas cisteínas en las 4CL de plantas están totalmente conservadas. Sin embargo, estas cisteínas no se conservan en AfeA ni en la mayoría de sus homólogos de otros hongos, ni en casi todas las 4CL-

Lk de *A. thaliana* (Fig. 8). En cambio, la segunda cisteína si se conserva en las 4CL-Lk de *A. thaliana*, a excepción de *At4g19010* y *At5g63380*; y la tercera cisteína se conserva en la 4CL-Lk *At3g21230*.

En las 4CL existe otro motivo RSKLPDI, el cual es exclusivo de estas enzimas (Cukovic *et al.*, 2001). Este motivo se encuentra cercano al extremo amino terminal y se desconoce su función. Como se observa en la Figura 8 casi todas la 4CL que se conocen lo presentan. Sin embargo, la mayoría de las 4CL-Lk no la presentan, a excepción de *At5g38120* y *At4g05160*. AfeA y sus homólogos no tienen esta secuencia. También en las 4CL está muy conservado el dominio KGVMLT que se encuentra adyacente al dominio de unión del AMP (Fig. 8). Sin embargo, algunos de estos residuos varían en las 4CL-Lk. En AfeA y sus homólogos no se conserva esta secuencia (Fig 8).

Otro motivo importante es el llamado caja L, el cual actúa como una unión entre el dominio amino terminal, que es muy largo y el dominio carboxilo terminal que es pequeño (Schneider *et al.*, 2005). La secuencia consenso del motivo L es: [DRLK][DE][L]. La mayoría de las 4CL y de las 4CL-Lk lo presentan (Fig 8). En el caso de AfeA también lo tiene. Los homólogos de AfeA en *A. nidulans* solo lo presentan: AN2674, AN4659, AN0649, AN5990, AN4397, AN5272, AN7631 y AN9081. El homólogo en *A. oryzae* no tiene este motivo, pero el de *A. fumigatus* si lo presenta.

En resumen, AfeA se parece a proteínas de función desconocida en los hongos, como a proteínas de *A. oryza* y en *A. fumigatus*. Sin embargo, AfeA muestra claramente las características de las proteínas de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato. Dentro de este grupo se parece principalmente a las 4CL-Lk, las cuales utilizan sustratos como diversos ácidos cinámicos, ácidos benzoicos y ácidos grasos para producir ésteres de CoA. Sin embargo, AfeA, a diferencia de la mayoría de las 4CL-Lk carece de una señal para el transporte al peroxisoma.

El gen *afeA* es necesario para la esporulación asexual

Para conocer si el gen *afeA* desempeña un papel en la fisiología celular se ideó una estrategia para inactivarlo. Para ello se quitaron 583 nucleótidos de *afeA* que codifican los aminoácidos que comprenden entre la glicina 145 y la fenilalanina 342 y se reemplazaron por el gen *argB*, que se utilizó como marcador selectivo (Fig. 10 A). Esto se logró al construir el plásmido pGS15 que tiene esta sustitución. El pGS15 tienen de un lado un fragmento de 1106 pb y del otro lado un fragmento de 647 pb de la región *afeA*, lo cual permite la integración por doble recombinación homóloga. Este vector se utilizó para transformar la cepa RMS011 que es auxótrofa para arginina. Se obtuvieron 96 transformantes Arg⁺, las cuales se purificaron y propagaron en un medio mínimo. Cinco de estas transformantes tuvieron un fenotipo algodonoso semejante al de las otras mutantes "fluffies" que hacen conidióforos en el centro de la colonia, pero no en la periferia (Wieser *et al.*, 1994). Estas transformantes se analizaron por experimentos tipo Southern blot al digerir el DNA genómico separadamente con *BstXI*, *NcoI* y *SphI* e hibridar con una sonda específica para *afeA* y *argB* (Fig. 10 B). Dos transformantes mostraron el patrón esperado, pero tuvieron además otras bandas que no se esperaban. Las otras tres transformantes mostraron patrones de hibridación limpios y consistentes con un solo evento de reemplazo genético por recombinación doble. A estas cepas se les llamó TGS1-TGS5 y la cepa TGS1 se utilizó para análisis posteriores.

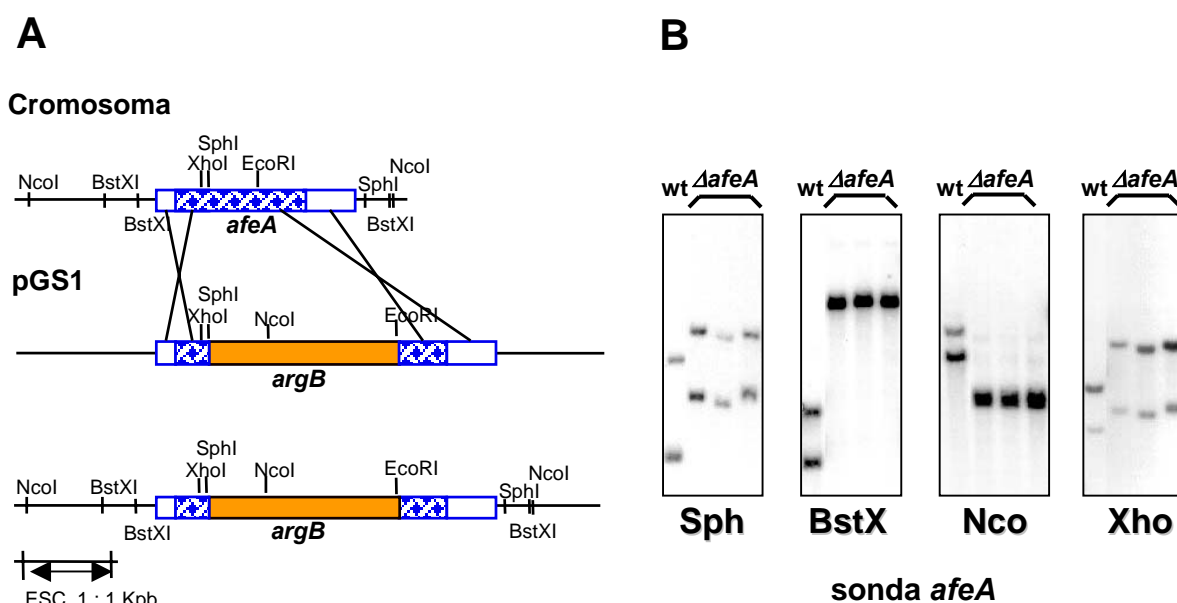


Figura 10. Interrupción del gen *afeA*. (A) El plásmido pGS15 se construyó al reemplazar una región de 583 pb del gen *afeA* por el gen *argB* como un marcador selectivo. La región que se eliminó corresponde de la glicina 145 a la fenilalanina 342 de AfeA. El plásmido pGS15 se linealizó y se usó para transformar a la cepa RMS011 que es una cepa que carece del gen *argB*. (B) El DNA total se extrajo de la cepa RMS011 y de las cepas con fenotipo *fluffy* y se digirió con cuatro diferentes enzimas de restricción. El DNA digerido se usó para realizar análisis tipo Southern blot hibridando con el fragmento Smal/Sal del plásmido pGS14 que es una sonda específica para *afeA*. La misma membrana se hibridó con el gen *argB* (dato no mostrado). Los patrones de hibridación son consistentes con el evento de integración que se ilustra en A.

La interrupción de *tmpA* (Soid-Raggi *et al.*, 2006) causa un fenotipo muy parecido al que se obtiene al interrumpir a *afeA*. Dado que *tmpA* y *afeA* se encuentran contiguos en el cromosoma VIII, decidimos excluir la posibilidad de que el reemplazo genético en *afeA* estuviera afectando la expresión de *tmpA*. Con este fin, se realizaron ensayos de complementación en diploides entre mutantes en estos dos genes (dato no mostrado). Se utilizaron las cepas TGS1, TGS2, TGS3, TGS4 o TGS5 todas con *afeA* inactivado y las cepas BL001 (Sánchez *et al.*, 1998), CGS1, CGS2, CGS3 o CGS5, todas con *tmpA* inactivado, pero además con un rearrreglo genético complejo (Soid-Raggi *et al.*, 2006). Los diploides entre TGS1-5/CGS1-3,5 mostraron una esporulación completamente silvestre. Asimismo se realizaron diploides entre una cepa que solo tiene *tmpA* inactivado, la cepa TGS6 (Soid-Raggi *et al.*, 2006), con la cepa que tiene *afeA* inactivado, la cepa TGS1. Los diploides también resultaron tener un fenotipo completamente silvestre. Esto confirma que *afeA* es diferente a *tmpA* y que al interrumpir al gen *afeA* no se afecta la función de *tmpA*. Por lo tanto, ambos genes se requieren individualmente para regular la esporulación

asexual de *A. nidulans*.

El gen *afeA* se requiere para la expresión del gen *brlA* y para responder a la carencia de nitrógeno

En *A. nidulans* el desarrollo de los tipos celulares que hacen posible la formación del conidióforo involucra la activación de muchos genes. El gen *brlA* es el principal activador para que esto se logre. Para conocer si *afeA* se requiere para la expresión de *brlA*, se realizaron cruces entre una cepa silvestre con una fusión del promotor *brlA* con el gen *lacZ*, el cual codifica para la β -galactosidasa (*brlA(p)::lacZ*) (Aguirre, 1993) y la cepa Δ *afeA* TGS1. Se seleccionó la cepa CGS43, la cual contiene tanto la mutación Δ *afeA* como el gen reportero *brlA(p)::lacZ*. Con esta cepa se realizaron experimentos de cultivos conidiantes sincrónicos al inducir la conidiación por exposición al aire. Se aislaron muestras a diferentes tiempos y se midió la actividad de la enzima β -galactosidasa. La Figura 11 muestra un experimento representativo y en ella se observa que la cepa TGS1 se encuentra en la clase de mutantes del tipo FLB (Wieser *et al.*, 1994). Esto es, del tipo *fluffy low brlA*, ya que, aún después de un tiempo prolongado, *brlA* no se expresa a un nivel mayor al 5% con respecto a la cepa silvestre. De esta forma, se observa que la mutante Δ *afeA* expresa tardíamente y en menor proporción a *brlA*, en comparación con una cepa silvestre con el mismo gen reportero. Por lo tanto, el gen *afeA* es un gen de expresión temprana, anterior a *brlA*, que se requiere para la expresión de este gen.

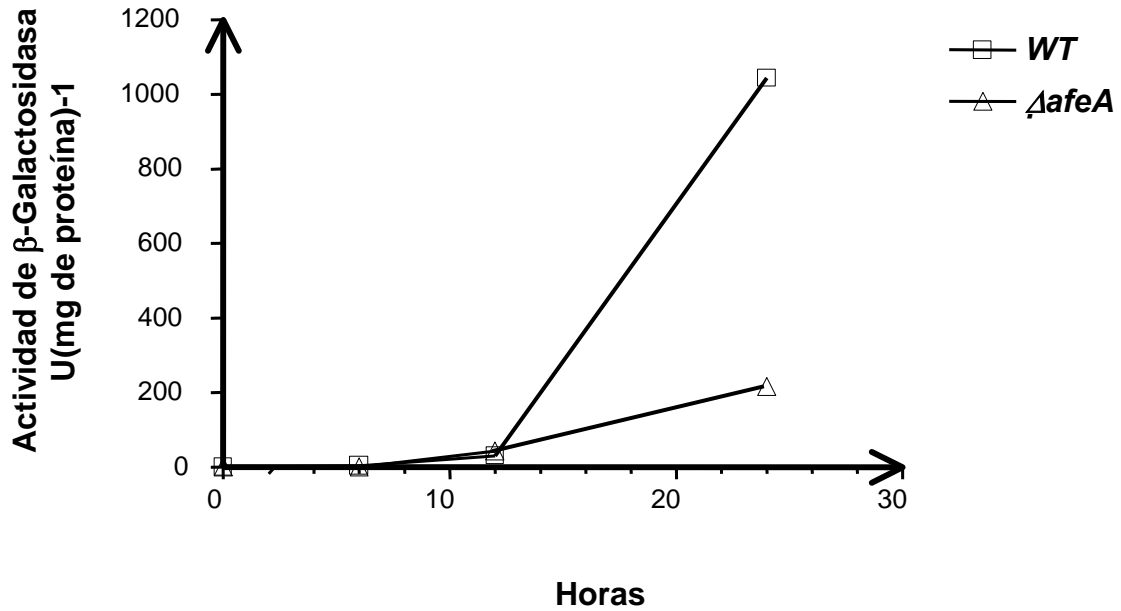


Figura 11. La cepa que carece del gen *afeA* expresa tardíamente y en menor proporción al gen *brlA*. Una cepa silvestre con la fusión genética *brlA(p)::lacZ* y una cepa isogénica, pero que carece del gen *afeA* se crecieron en medio líquido por 18 horas y después de este tiempo se expusieron al aire en medio sólido. Se tomaron muestras a los tiempos que se indican y se utilizaron para medir la actividad de β -galactosidasa.

Dado, que el gen *afeA* regula la expresión de *brlA*, se analizó también la expresión de *afeA* durante la conidiación por exposición al aire. Como se observa en la Figura 12 y 13 el gen *afeA* codifica para un transcrito más grande que el RNA ribosomal 18S, que mide 1.67 Kb. Este transcrito está presente durante el crecimiento (0 h) y su nivel permanece relativamente constante durante la esporulación asexual (Fig 12 A) y sexual (Figs. 12 y 13, respectivamente). Sin embargo, al igual que *tmpA*, su expresión se incrementa en ausencia de una fuente de nitrógeno (Fig. 13).

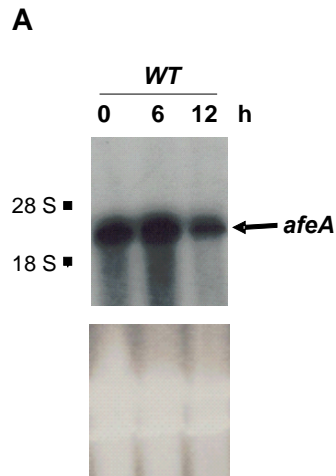


Figura 12. Los niveles del transcrito *afeA* permanecen relativamente constantes durante el crecimiento y la conidiación. El RNA total se aisló de la cepa silvestre TJA22 que se creció por 18 horas en medio líquido (0 h) y de cultivos sincrónicos inducidos a conidiar por exposición al aire, durante 6 y 12 horas. Con él se realizaron hibridaciones tipo Northern utilizando una sonda específica de *afeA*. Las posiciones de los RNA ribosomales se indican con puntos y el mRNA de *afeA* se indica con una flecha. En el panel inferior se observa el RNA ribosomal como control de cargado.

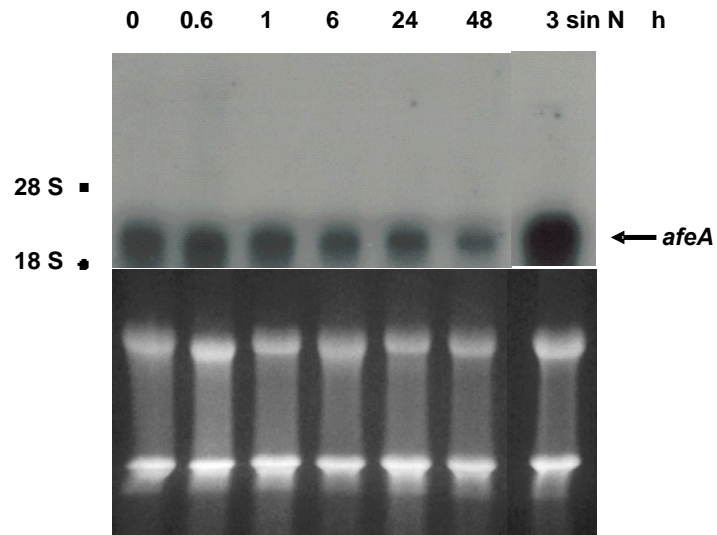
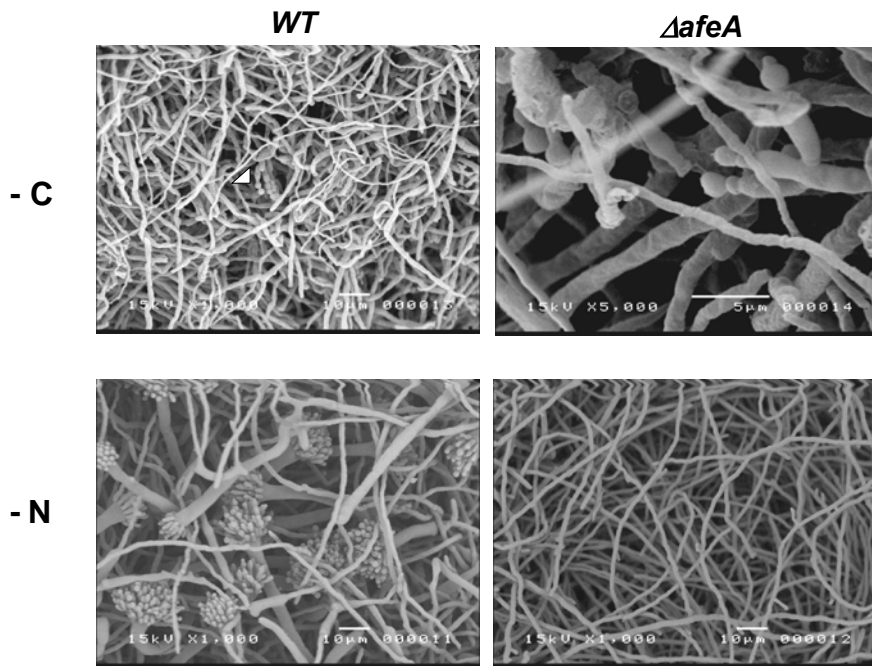


Figura 13. Expresión de *afeA* durante el desarrollo sexual y su inducción con la carencia de una fuente de nitrógeno. La cepa silvestre CLK43 se indujo a realizar el desarrollo sexual (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) a los tiempos que se indican o se transfirió a un medio sin fuente de nitrógeno por tres horas. De estas muestras se extrajo el RNA total y se analizó por Northern blot hibridando con una sonda específica para *afeA*. El panel de abajo muestra los RNA ribosomales que se usaron como control de cargado.

Además de la exposición al aire, la carencia de nutrientes también induce la expresión de *brlA* y la conidiación, mientras que en medio líquido la presencia de nutrientes impide la conidiación (Skromne *et al.*, 1995). En una cepa silvestre la carencia de carbono induce la formación de conidióforos morfológicamente reducidos,

los cuales forman esporas directamente de las puntas de las hifas. En contraste, la carencia de nitrógeno induce la formación de conidióforos morfológicamente complejos, similares a los que se forman en una interfase aérea (Fig. 1 A, paneles izquierdos). En la mutante $\Delta afeA$, la carencia de carbono también induce la formación de conidióforos reducidos (Fig. 14 A, panel superior derecho). Sin embargo, estas mutantes, de igual manera que las mutantes $\Delta tmpA$ (Soid-Raggi *et al.*, 2006), son incapaces de formar cualquier tipo de conidióforos ante la carencia de una fuente de nitrógeno (Fig. 14 A, panel inferior derecho). La necesidad de *afeA* para responder a la carencia de nitrógeno se observa también a nivel de la expresión de *brlA*. En condiciones de carencia de carbono, la expresión de *brlA* en una mutante $\Delta afeA$ es menor que en la silvestre (Fig. 14 B). Sin embargo hay esporulación igual que en una cepa silvestre, probablemente porque se alcanza el nivel suficiente de expresión de *brlA*. Sin embargo, en condiciones de carencia de nitrógeno la expresión de *brlA* es todavía menor, inferior al 50%, que el observado en una cepa silvestre (Fig. 14 B) y no ocurre esporulación. Probablemente porque no se alcanza el umbral suficiente de expresión de *brlA*. Por lo tanto, en medio líquido el gen *afeA* no se requiere para la conidiación en respuesta a la carencia de carbono, pero es indispensable para la conidiación en respuesta a la carencia de nitrógeno.

A



B

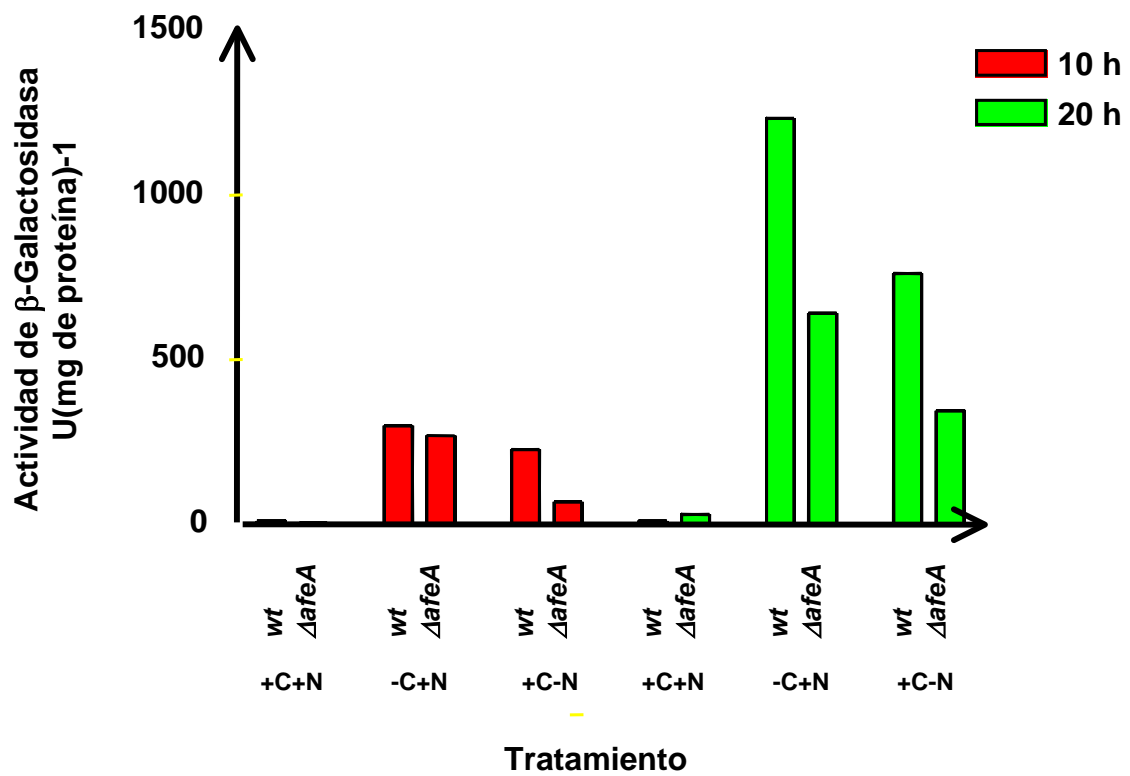


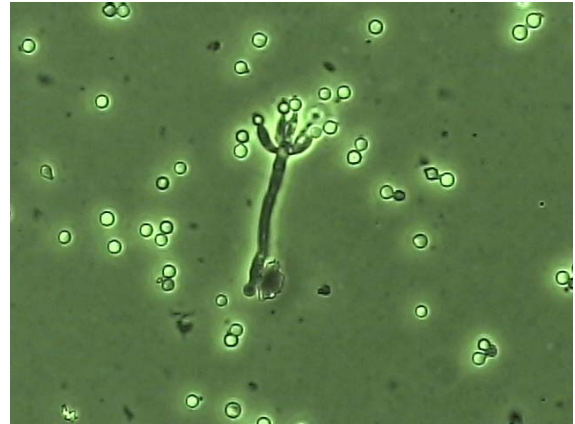
Figura 14. El gen *afeA* se requiere para la esporulación y para que el gen *brlA* se exprese a niveles suficientes durante la carencia de nitrógeno, pero no durante la carencia de carbono. A) La cepa silvestre TJA22 (paneles izquierdos) y la cepa $\Delta afeA$ CGS17 (paneles derechos) se crecieron 18 horas en medio mínimo y se cambiaron a medios carentes de carbono (paneles superiores) o de nitrógeno (paneles inferiores). A las 20 horas las muestras se procesaron para microscopía electrónica. B) Muestras de 10 y 20 horas, se utilizaron para medir la actividad de β -galactosidasa.

El gen *afeA* regula la conidiación a través de una vía independiente de *fluG*

Se conocen dos vías que regulan el crecimiento y el desarrollo. En una vía la subunidad α de la proteína G trimérica FadA estimula el crecimiento e inhibe la conidiación (Yu *et al.*, 1996). En la otra vía, el gen *fluG*, que se encuentra al inicio de esta vía, estimula la conidiación (Lee y Adams, 1994). La sobre-expresión de *fluG* induce la conidiación (Fig. 15, panel izquierdo). Para determinar si *afeA* forma parte de la vía de *fluG*, se transfirió la fusión genética *alcA::fluG* a un fondo genético $\Delta afeA$. Como se observa en la Figura 15, panel derecho, la sobre-expresión de *fluG* en un fondo genético $\Delta afeA$ también es capaz de inducir la esporulación. Por lo tanto, al sobre-expresar el gen *fluG*, el gen *afeA* no es necesario para inducir la esporulación. De esta forma, es posible que *afeA* se encuentra en la vía de *fluG*, pero antes de *fluG*. Alternativamente, el gen *afeA* pertenece a una vía independiente de *fluG*. Para distinguir entre estas dos hipótesis se obtuvo una mutante doble $\Delta fluG; \Delta afeA$. Como se observa en la Figura 16, una mutante $\Delta afeA$ se observa *fluffy* y el número de esporas es menor con respecto a una cepa silvestre (Fig. 16, paneles izquierdos). Una mutante $\Delta fluG$ (panel superior derecho) se observa un poco más *fluffy* y produce aún menos esporas que una $\Delta afeA$. Una mutante doble $\Delta fluG; \Delta afeA$ es drásticamente más *fluffy* y el número de esporas es dos órdenes de magnitud menor, respecto a las mutantes sencillas en estos genes (panel inferior derecho). Estos resultados muestran que los fenotipos *fluffy* causados por las mutaciones $\Delta fluG$ y $\Delta afeA$ son aditivos. Por lo tanto, indican que el gen *afeA* no es parte de la vía de *fluG*, sino que *afeA* es parte de una vía independiente de *fluG* que regula la conidiación.



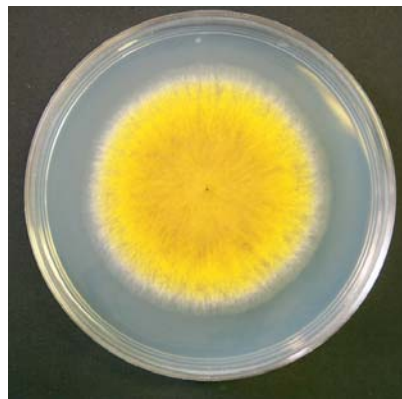
alcA::fluG(387-865)



alcA::fluG(387-865); ΔafeA

Figura 15. El gen *afeA* actúa en una vía independiente del gen *fluG*. Una cepa silvestre con la fusión genética *alcA::fluG* y una cepa isogénica que carece del gen *afeA* se crecieron en MM con glucosa por 14 horas. Después de este tiempo, para inducir la fusión *alcA*, se cambiaron a MM sin glucosa con treonina por 12 horas y se realizaron observaciones al microscopio óptico.

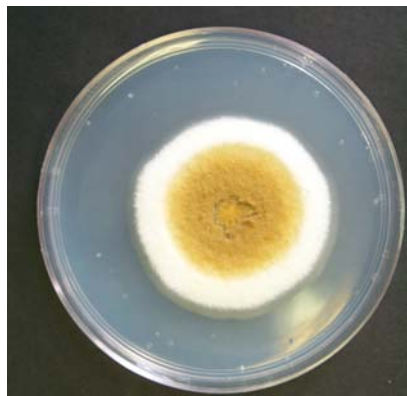
A



WT



ΔfluG



ΔafeA



ΔfluG; ΔafeA

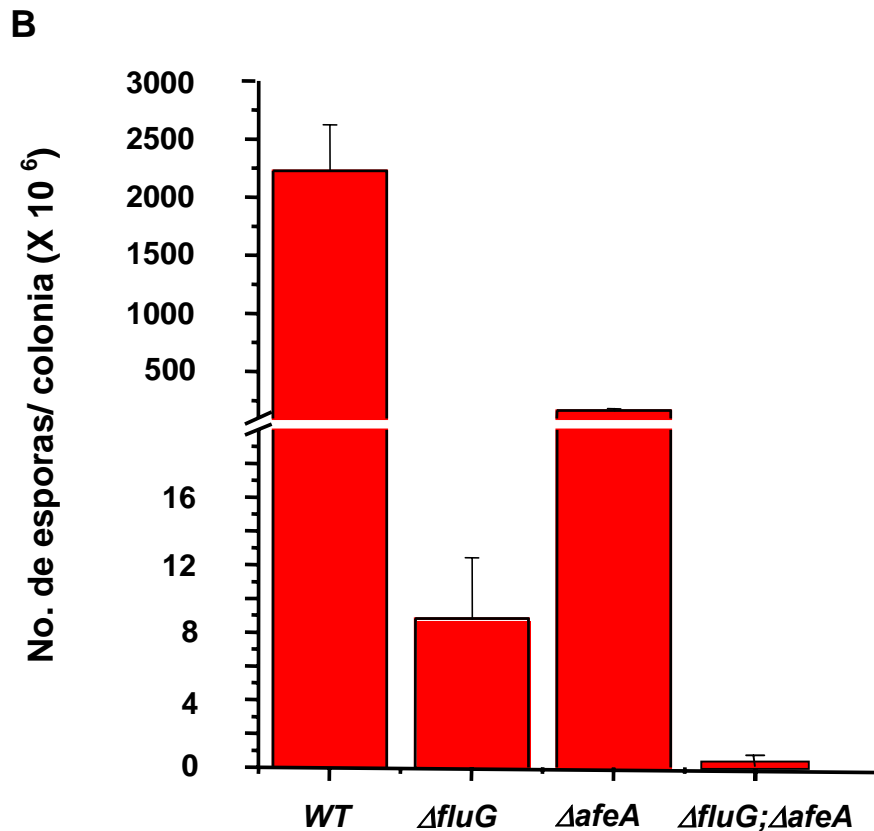


Figura 16. Una mutante doble $\Delta fluG; \Delta afeA$ tiene un fenotipo más algodonoso que las mutantes en un solo gen. A) Las cepas WT, $\Delta fluG$, $\Delta afeA$ y $\Delta fluG; \Delta afeA$ se inocularon por punto y se crecieron a 37°C durante cinco días. B) Las mismas cepas se inocularon por triplicado y de las colonias resultantes se contó el número total de esporas por colonia. Las barras representan la desviación estándar.

El gen *afeA* participa en la producción de un factor extracelular que induce la conidiación

Las mutantes nulas *fluG* tienen la característica especial de que conidian como una cepa silvestre cuando crecen junto a una cepa silvestre o a otra mutante *fluffy* (Lee y Adams, 1994). La mutante $\Delta tmpA$ se comporta de una manera similar (Soid-Raggi *et al.*, 2006) y también la mutante $\Delta afeA$. Al crecer las cepas con fenotipo *fluffy* de esporas verdes y que tienen genes mutados diferentes a *afeA*, junto a una mutante *fluffy* $\Delta afeA$ de esporas amarillas, se observa una línea de complementación en la que se forman conidióforos con esporas amarillas silvestres (Fig 17, paneles C y D). Este comportamiento no ocurre al poner dos mutantes $\Delta afeA$, con distinto color de esporas,

una junto a la otra (dato no mostrado). Tampoco es un comportamiento genérico de todas las mutantes *fluffy*. Por ejemplo, las mutantes $\Delta flbB$ o $\Delta flbA$ no se complementan al crecer junto a una cepa silvestre (Fig. 17, paneles A y B). Por el contrario, al poner juntas una mutante $\Delta fluG$ y una mutante $\Delta afeA$ se observan una complementación en ambos sentidos o cruzada (Fig. 17, panel C). Al transferir esporas provenientes de estas regiones de complementación en un medio con los requerimientos de ambas cepas, en todos los casos se recuperan colonias con el fenotipo *fluffy* original (dato no mostrado). Al plaquear en medio mínimo sin suplementos estas regiones de complementación no crece ninguna colonia. Esto indica que este comportamiento no se debe a una complementación genética generada por anastomosis de las hifas. Para confirmar esta interpretación, se creció una cepa silvestre que produce esporas verdes, y encima se colocó una membrana Millipore de 0.4μ que no permite el paso de las hifas, y encima se inoculó una cepa $\Delta afeA$ capaz de producir esporas amarillas. Como se observa en la Figura 18 D, la cepa $\Delta afeA$ se observa menos *fluffy* y produce esporas de color amarillo. Por el contrario, una cepa $\Delta afeA$ crecida sobre otra cepa $\Delta afeA$ se sigue observando muy *fluffy* (Fig. 18 C). En otro tipo de experimento, se creció una cepa silvestre por 24 horas y, después de quitar el micelio, el medio de cultivo se filtró y esterilizó con Millipore con un poro de $0.22 \mu m$. En este mismo medio estéril se inocularon esporas de la cepa $\Delta afeA$. Como se observa en la Figura 19 C, el medio condicionado fue capaz de inducir la esporulación de una mutante $\Delta afeA$. Contrariamente, esto no ocurrió cuando el medio condicionado se obtuvo a partir de otra mutante $\Delta afeA$ (Fig. 19 B). Por lo tanto, la cepa con la interrupción de *afeA* se complementa parcialmente cuando se crece en un medio donde previamente se creció una cepa silvestre. Esto sugiere que la cepa $\Delta afeA$ no tiene la capacidad para producir un factor difusible que es necesario para la esporulación y, por lo tanto, el gen *afeA* participa en la producción de este factor.

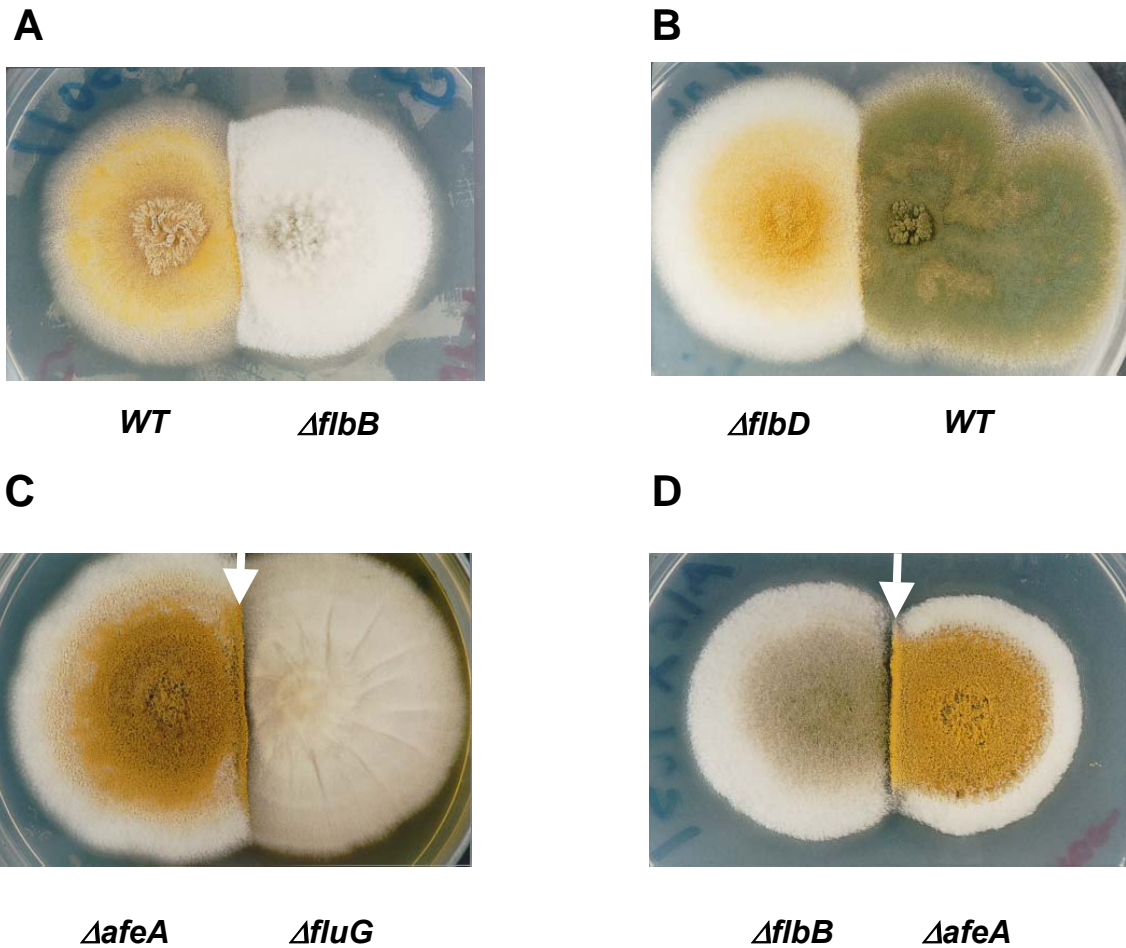


Figura 17. La mutante $\Delta afeA$ conidia cuando crece junto a otra cepa con fenotipo algodonoso mutada en un gen diferente a $afeA$. Este comportamiento no es general de todas las cepas con fenotipo algodonoso. La cepa CJA16, que produce esporas verdes y esta mutada en el gen *flbB*, y la cepa TJW30.1, que produce esporas amarillas y está mutada en el gen *flbD*, no generaron ninguna línea de complementación extracelular al inocularse junto a la cepa RMS011, que es una cepa amarilla con esporulación silvestre, o junto a la cepa FGSC26, que es una cepa con esporas verdes y con esporulación silvestre, respectivamente (A y B, respectivamente). La cepa TGS1, que produce esporas amarillas y carece del gen *afeA*, se inoculó junto a la cepa RBN119, que es una cepa que produce esporas verdes y que carece del gen *fluG* (C) y junto a la cepa CJA16 (D) y en ambas se observó una línea de complementación de esporas amarillas (flechas blancas).

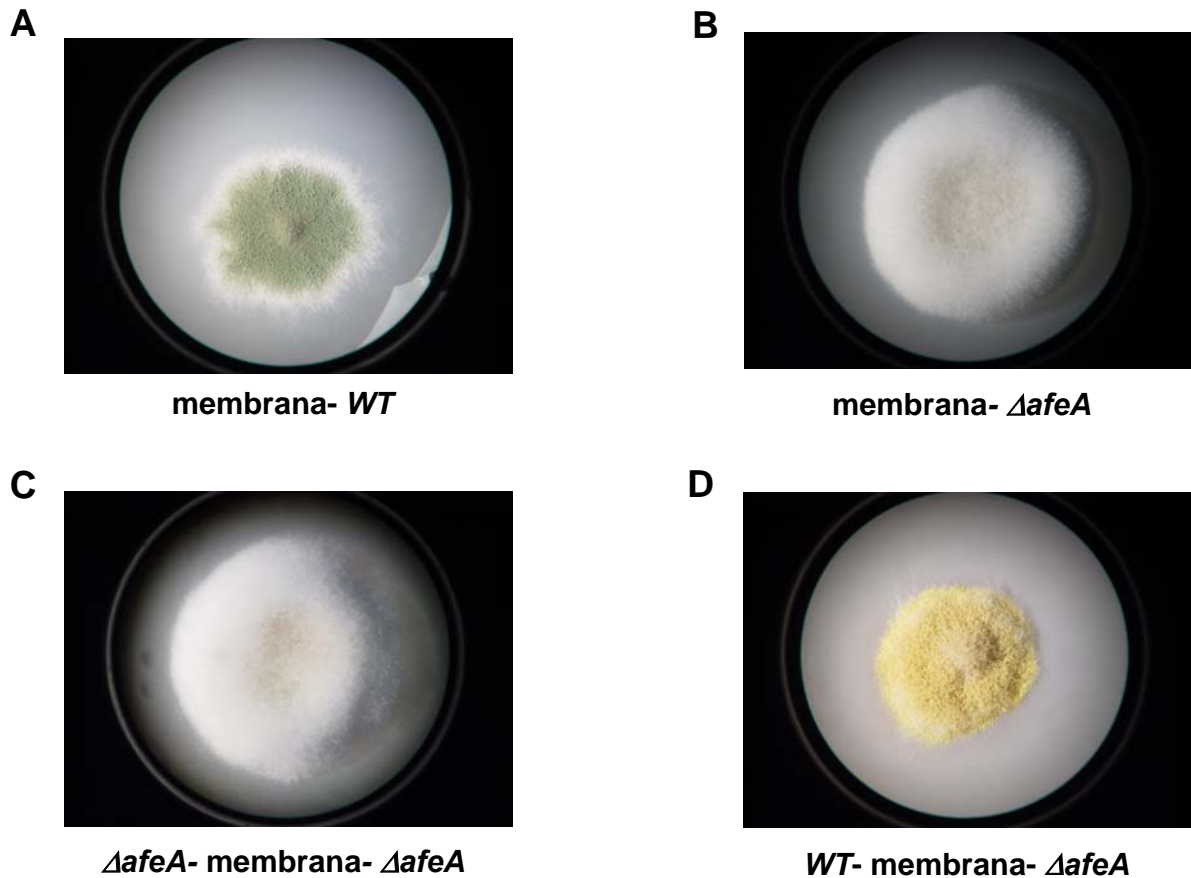


Figura 18. La cepa Δ afeA conidia cuando crece junto a una silvestre aún si se impide el contacto directo entre las hifas. Una cepa silvestre verde, FGSC26, (A), y una cepa amarilla Δ afeA, TGS1, (B) se crecieron sobre una membrana de Millipore isopore con un poro de 0.4 μ m. Una cepa verde Δ afeA, CGS17, (C) y la cepa silvestre, FGSC26, (D) se crecieron 18 horas y después se cubrieron con la membrana Millipore. Encima de la membrana se inoculó, en ambas cepas, la cepa TGS1. Todas las cepas se crecieron en MM sólido de Käfer con 100 mM de fosfatos (Martinelli, 1976) y se fotografiaron a las 72 horas.

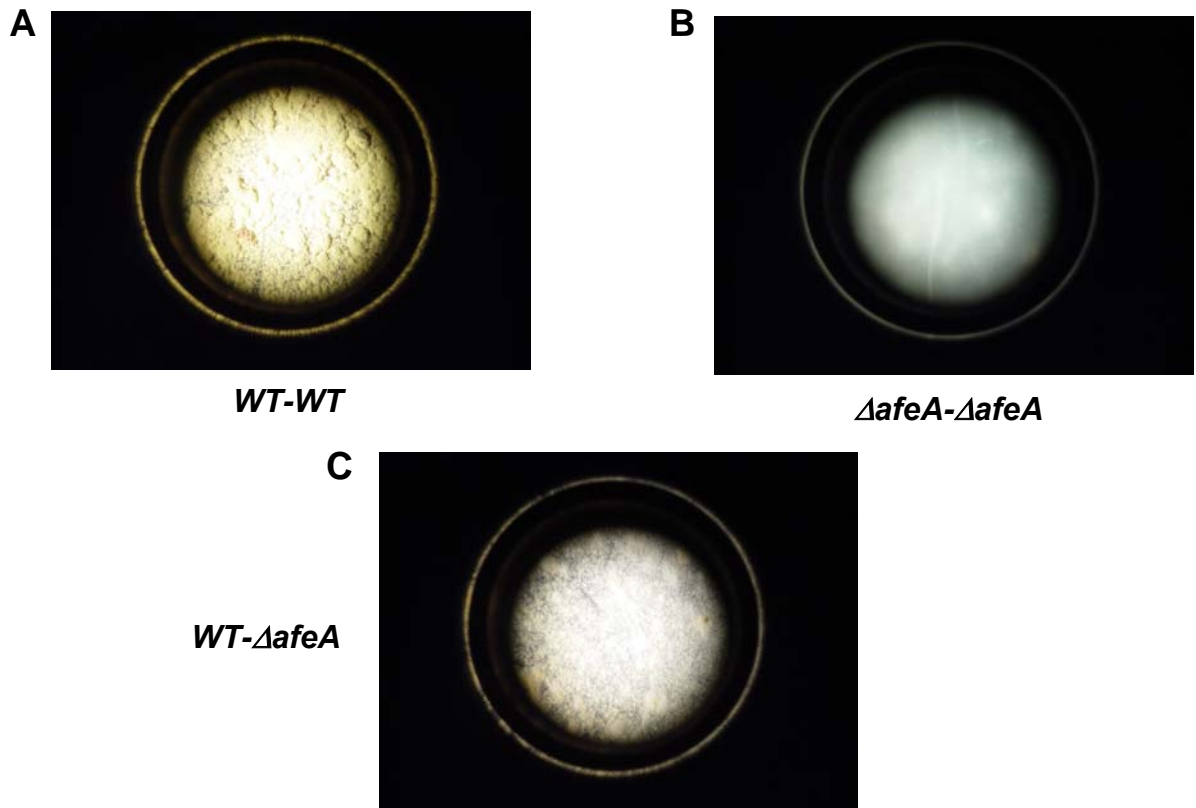


Figura 19. La cepa $\Delta afeA$ se complementa parcialmente cuando se crece en un medio donde previamente creció una cepa silvestre. Una cepa silvestre CLK43 (A y C) o la cepa $\Delta afeA$, TGS1, (B) se crecieron 24 horas y después se removió el micelio y el medio se filtró por Millipore con un poro de $0.22 \mu\text{m}$ y se utilizó para inocular las cepas CLK43 (A) y TGS1 (B y C). Los cultivos se observaron después de 45 horas de crecimiento. Se utilizó medio mínimo de Martinelli (Martinelli, 1976).

V. DISCUSIÓN GENERAL

Nuevas mutantes *fluffy*

Nuestro interés es entender la diferenciación celular que ocurre durante la conidiación de *A. nidulans*. Las mutantes algodonosas o mutantes *fluffy* son un poderosa herramienta para este fin y para entender la regulación del gen *briA*, que es el gen regulador esencial para la conidiación. Según Thomas Adams y sus colaboradores (1994) el aislamiento de mutantes *fluffy* que realizó fue a saturación, ya que al seguir aislando más mutantes *fluffy* encontraron alelos múltiples para casi todos los *loci*. Sin embargo, previamente Gordon Dorn en 1970 aisló mutantes *fluffy*. Estas mutantes no se guardaron en ninguna colección y se perdieron. Sin embargo, en cuatro de estas mutantes se logró precisar el cromosoma en el que se encontraban las mutaciones: *flu7* que se encontraba en el cromosoma I y a *flu2*, *flu3* y *flu4* que se encontraban en el cromosoma VIII. Esta localización cromosomal no coincide con la localización de los genes que encontró Thomas Adams, ya que *flbA* y *flbE* están en el cromosoma I, *fluG* está en el cromosoma III, *flbB* en el cromosoma IV, *flbC* en el cromosoma VII y *flbD* y *fluF* están en el cromosoma VIII. Esto sugería la existencia de más genes, cuya mutación produce un fenotipo *fluffy*. En este trabajo encontramos dos nuevos genes *afeA* y *tmpA*, cuya mutación produce un fenotipo *fluffy*. Estos genes se encuentran en el cromosoma VIII, por lo que podrían corresponder a los genes que describió Dorn *flu2*, *flu3*, *flu4*, o tal vez *flu1* o *flu11*, cuya número de cromosoma no se pudo precisar con exactitud. Estos resultados indican que el aislamiento de mutantes *fluffy* no se ha realizado a saturación y, que probablemente haya más genes por identificar cuya mutación produzca un fenotipo *fluffy*.

El REMI como una método para mutagenizar y clonar los genes mutados

En el primer trabajo de esta tesis se utilizó el método integración mediada por enzimas de restricción o REMI (*restriction enzyme-mediated integration*) (Schiestl y Petes, 1991). El método REMI es un procedimiento para mutagenizar y marcar los genes mutados para poder posteriormente clonarlos. El REMI se basa en transformar una cepa en presencia de una enzima de restricción y un fragmento de DNA o un plásmido linealizado con la misma enzima. El resultado del REMI es consistente con la idea de que la enzima de restricción corta al azar el genoma y el plásmido se integra en uno de los sitios que se generan. En este caso, usamos para transformar la enzima *BamHI* y un plásmido que tiene como marcador selectivo el gen *argB*, el plásmido pDC1, y utilizamos una cepa carente de este gen como cepa receptora (Sánchez *et al.*, 1998). Para recuperar el plásmido más las secuencias flanqueantes, es decir, el gen de interés, del DNA genómico de la mutante algodonosa que se obtuvo con el REMI, se digirió con una enzima que no corta el pDC1. Se ligó y transformó *Escherichia coli*. A este plásmido se le llamó pREMI1. El análisis tipo Southern del DNA genómico de las mutantes algodonosas al hibridar con la secuencia que se recuperó de pREMI1 sugirió que se había obtenido una cepa con el evento REMI esperado: una sola integración del plásmido pDC1 y la preservación de los sitios *BamHI*. Sin embargo, tuvimos problemas para identificar el gen responsable del fenotipo algodonoso y para determinar el evento molecular que ocurrió durante el REMI. Al realizar el análisis de ligamiento genético observamos que los genes *argB* y *tmpA* cosegregaban. Este hecho apoyó más la idea de que el gen responsable del fenotipo *fluffy* estaba interrumpido por el gen *argB*. Esto nos impidió observar que había sucedido un rearrreglo genético muy complejo. Además el plásmido que se recuperó de la mutante, presenta el mismo rearrreglo genético que la mutante. Por lo tanto, en hibridaciones tipo Southern blot de la mutante algodonosa con todo el inserto del pREMI1, pero sin el gen *argB* como sonda, no pudimos detectar dicho rearrreglo. Este rearrreglo lo empezamos a deducir al transformar a la mutante algodonosa original que se

obtuvo por REMI con los cósmidos de la biblioteca genómica de *A. nidulans* (Brody, 1991) que hibridaron con el inserto pREMI1 y no obtener complementación del fenotipo mutante. Asimismo, el rearreglo se dedujo al dividir el inserto del pREMI1 en dos: sonda izquierda y sonda derecha e hibridar con ellas separadamente el DNA genómico de la cepa silvestre receptora y de la mutante algodonosa. Se obtuvieron patrones de hibridación diferentes con una y otra sonda. Otro indicio de que había sucedido un rearreglo fue que al hibridar los cósmidos identificados con todo el inserto del pREMI1, algunos que hibridaban con la sonda izquierda no lo hacían con la sonda derecha. Esto indicó que la pérdida de material genético del sitio no estaba contenida en un sólo cósmido. Para resolver esto hibridamos nuevamente la biblioteca genómica de cósmidos solamente con la sonda derecha. Se identificaron dos nuevos cósmidos que complementaron el fenotipo *fluffy*. Posteriormente, el rearreglo genético lo comprobamos al secuenciar la parte correspondiente de un cósmido y comparar la secuencia con la del inserto pREMI1. Finalmente el tamaño exacto del DNA genómico que sufrió el rearreglo (Soid-Raggi *et al.*, 2006) lo conocimos recientemente cuando la secuencia genómica se publicó totalmente ensamblada. El hecho de que haya ocurrido el rearreglo genético tan complejo que ocurrió al realizar el REMI, sugiere que es probable que esta zona sea de alta recombinación, es decir, sea un *hot spot*. Esto es consistente con que al tratar de aislar mutantes algodonosas por trasposones, un método similar al REMI, se han aislado mutantes en estos mismo genes: *afeA* y *tmpA* (C. Schazzochio, comunicación personal).

En este caso, la mutante que se obtuvo por REMI se obtuvo al transformar con el plásmido lineal más 50 U de enzima (Sánchez *et al.*, 1998). Probablemente esta cantidad fue excesiva y esto provocó ruptura de material genético y, por lo tanto, el rearreglo genético. Debido a ésto, en un futuro se podrían utilizar cantidades menores de enzima. De este modo para asegurarse de que la mutante presenta el evento esperado, se podrían secuenciar los insertos del pREMI1 y compararlos con la secuencia genómica. Asimismo, se

podrían realizar PCRs del DNA genómico de las cepas silvestres y de las mutantes con oligonucleótidos diseñados en los lados derecho e izquierdo del inserto pREMI1. En las cepas silvestres se esperaría un producto más pequeño que en las mutantes que se produjeran por REMI. En estas mutantes se esperaría un producto más grande por la integración del plásmido. La diferencia de tamaño dependería del tamaño del plásmido utilizado en la transformación. Si en la cepa silvestre se generara un producto del tamaño adecuado y en la mutante se generara un tamaño diferente al esperado, o no se generara ningún producto, dicha mutante tendría que descartarse por la dificultad de la clonación del gen responsable del fenotipo. Sin embargo, si se toma en consideración todo lo anterior, no obstante a la fuerte posibilidad de que ocurran rearrreglos genéticos, el método REMI es útil para mutagenizar y clonar genes mutados que participen en la conidiación o en cualquier otro proceso sin importar la índole del gene. Por lo tanto, en este trabajo, el uso del REMI nos permitió identificar al gene *tmpA* que no se había identificado previamente en una mutagénesis química exhaustiva. Sin embargo, como esta metodología generó un rearrreglo genómico que fue difícil de discernir. Esto llevó a que en nuestro laboratorio se dejara de utilizar el REMI como método de mutagénesis. No obstante, tomando en cuenta las precauciones que se mencionaron, el REMI es una herramienta poderosa.

En la mutante algodonosa original que se obtuvo por REMI, la enzima cortó en un sitio, pero se perdieron de ese lugar alrededor de 3.3 Mpb (Soid-Raggi *et al.*, 2006). Además, todo o parte de ese fragmento que se perdió se integró en otro sitio, es decir, sucedió una translocación. Sin embargo, no sabemos si hubo pérdida parcial de material genético o inactivación de éste por integrarse en otro sitio. Hay ejemplos donde la pérdida de material genético no tiene efectos aparentes sobre el fenotipo. Por ejemplo, al menos 130 kpb son dispensables en el brazo derecho del cromosoma III, es decir, al menos 0.5% del genoma total de *A. nidulans* (Caddick *et al.*, 1986). Otro ejemplo es el cluster *SpoC1* que comprende 38 kpb, cuya anulación no causa ningún fenotipo detectable

(Aramayo *et al.*, 1988). En el caso de la cepa que se obtuvo por REMI, esta cepa es viable, lo cual puede ser porque efectivamente no se perdió nada de material genético, sino que simplemente hubo una translocación. O también puede ser porque, aunque se hubiera perdido material genético, muchos genes en los hongos tienen funciones redundantes.

Los genes *afeA* y *tmpA* se encuentran adyacentes en el genoma de *A. nidulans*

A. nidulans, como todos los eucariotes no tiene operones, pero una variación a esto es que posee muchos genes que se arreglan en grupos (*clusters*), ya que comparten elementos regulatorios. Los primeros *clusters* de genes se descubrieron por Zimmermann *et al.*, (1980) y Orr y Timberlake, (1982). Ellos encontraron que aproximadamente 200 mRNAs se expresan en los conidios y que el 81% se encuentra en *clusters* con un promedio de 3.3 genes por *cluster*. Esto implica que hay alrededor de 50 *clusters*. Los genes *afeA* y *tmpA* podrían ser parte de uno de ellos, ya que se encuentran a 2.3 Kpb de distancia (Soid-Raggi *et al.*, 2006). Por lo que se podrían regular de manera similar y formar parte de la misma vía biosintética. Los homólogos de *tmpA* y *afeA* en otros *Aspergilli* como en *A. fumigatus* y en *A. oryzae*, aunque no se encuentran adyacentes, se encuentran en el mismo contig (dato no mostrado). En estas especies de *Aspergilli* se observa mucha sintenia a lo largo de sus genomas.

AfeA se parece a proteínas tipo cumarato ligasas que pertenece a la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato

Como se observa en la Figura 8 y 9 B, AfeA se parece más a una proteína hipotética de *A. oryzae* y a dos proteínas de *A. fumigatus*. Esto es consistente con que el genoma de *A. nidulans* se parece más al genoma de *A. oryzae* que al

de *A. fumigatus*. Sin embargo, ambas especies tienen una identidad entre el 66 y 67% con *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005). La proteína AfeA de *A. nidulans* es más similar a otras proteínas de otros *Aspergilli* que a sus propias proteínas (Fig. 8). Esto sugiere que en *A. nidulans* hubo duplicación y divergencia de estas proteínas antes de la emergencia de las especies de *Aspergilli*. De manera semejante, pero aún más drástica, por ejemplo en la flor del tabaco, *Nicotiana tabacum*, el homólogo de AfeA es más similar al homólogo de la papa que a otros de su misma especie.

AfeA presenta un dominio que se encuentra en las proteínas de procariotes y de eucariotes, las cuales forman la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato. Estas enzimas funcionan con un mecanismo en dos pasos. Utilizan como sustrato un ácido carboxílico y en un primer paso reaccionan con el ATP para formar un intermediario de adenilato (acil-AMP). Los otros dos fosforilos del ATP se liberan como pirofosfato. En un segundo paso, el grupo acilo se transfiere a un aceptor, que en muchos casos es CoA. De esta forma, el grupo sulfhidrilo de la CoA reacciona con el adenilato para formar acilo-CoA, formándose un éster de CoA y liberando el AMP. Esta superfamilia incluye enzimas muy diversas de tamaño diferente y que utilizan sustratos muy diferentes. Sin embargo, los miembros de esta superfamilia presentan varios dominios conservados, como la caja I SSGTTGXPKG y la caja II, GEICIRG (Ehltling *et al.*, 1999; Fulda *et al.*, 1994; Stuitable *et al.*, 2000). Además AfeA y sus homólogos conservan la lisina 540 que es indispensable para la catálisis. En AfeA esta lisina es funcional, ya que su sustitución por asparagina provoca un fenotipo *fluffy*, aunque ligeramente menor que el que produce la interrupción del gen *afeA* (O. Sánchez, comunicación personal).

Entre los miembros de esta superfamilia están las 4-cumarato ligasas (4CL), las acetilCoA sintetasas y las acilCoA sintetasas. Otros miembros son la luciferasa y las péptido sintetasas no ribosomales. La luciferasa es la enzima que produce luz en las luciérnagas (Schroder, 1989; Toh, 1990). Las péptido

sintetasas no ribosomales son enzimas modulares características de bacterias y de hongos. Estas enzimas activan los aminoácidos en la síntesis no convencional de polipéptidos y producen oligopéptidos bioactivos con una gran diversidad estructural. También pueden usar aminoácidos no proteínogénicos, tales como los aminoácidos α -hidroxiácidos, N-metilados y D-aminoácidos (Reuter *et al.*, 1999). Estas enzimas se pueden encontrar como dominios integrados, en el caso de la clase I, o como unidades separadas, en el caso de la clase II. En el caso de que AfeA formara parte de una péptido sintetasa no ribosomal, el tamaño de su mRNA nos indica que AfeA es pequeña y que sería una unidad individual de la clase II. El módulo mínimo comprende tres dominios: 1) el dominio de adenilación que cataliza la formación de un aminoacilo-adenosina monofosfato a partir de un aminoácido conocido y ATP, liberando pirofosfato (Turgay *et al.*, 1992). La proteína TmpB, que en su extremo carboxilo terminal es muy parecida a TmpA, presenta un dominio de este tipo en su extremo amino terminal. 2) El dominio adyacente que es la proteína acarreadora de peptidilos (PCP), que contiene el grupo prostético 4'-fosfopanteteinilo, con el cual el aminoácido activado se une covalentemente con una unión tioéster (Stachelhaus *et al.*, 1996); y 3) El dominio de condensación que finalmente regula la condensación directa de un intermediario tioesterificado con otro aminoácido en la cadena en crecimiento (Stachelhaus, *et al.* 1998).

La proteína AfeA se parece particularmente a las proteínas tipo cumarato ligasas (4CL-Lk) (Fig. 9 B). Las 4CL convencionales son la tercera enzima en la vía de síntesis general de los fenilpropanoides. En las plantas se requieren para la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios (Fig. 20). La vía se inicia con la reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL) que desamina la fenilalanina para formar un ácido cinámico (Neustaedter *et al.*, 1999). En seguida se forman diversos ácidos hidroxicinámicos por la acción de las hidroxilasas y O-metiltransferasas, tales como las enzimas cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y la ácido cafeíco-O-metiltransferasa (Douglas, 1996). Un paso subsecuente es la formación de ésteres de coenzima-A (CoA) de dichos

ácidos a través de la acción de las 4CL. Las 4CL catalizan la conversión de tres derivados del ácido cinámico: el ácido 4-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico), el ácido cafeíco (ácido 3,4-dihidroxicinámico) y el ácido ferúlico (ácido-3-metoxi-4-hidroxicinámico) para formar ésteres de CoA en una reacción en dos pasos. También es sustrato de la 4CL el ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) y el ácido hidroxiferúlico (ácido 3-metoxi-4,5-hidroxicinámico). Las 4CL son entonces capaces de unir varios derivados del ácido cinámico a la CoA para formar de diferentes componentes aromáticos (Hahlbrock y Grisebach, 1979).

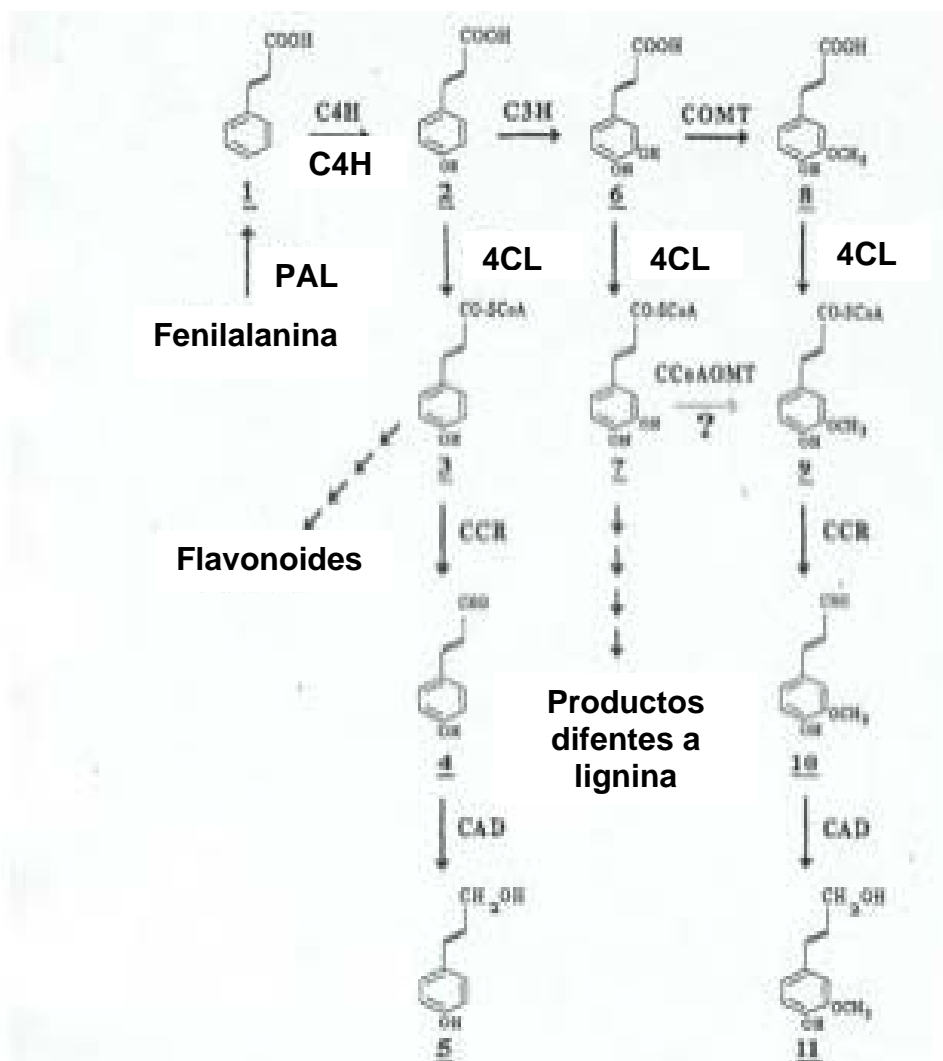


Figura 20. Vía de la síntesis de los fenilpropanoides en las plantas (tomado de Zhang and Chiang, 1997).

Los ésteres de hidroxicinamoil que se sintetizan por la 4CL son sustrato en

diferentes vías de los fenilpropanoides, que varían de acuerdo al tipo celular (Dixon y Pavia, 1995; Hahlbrock y Scheel, 1989). Por ejemplo, la cumaril-CoA es sustrato para la chalcona sintetasa que cataliza el primer paso de la biosíntesis de los flavonoides. También es sustrato, junto con la feruloil-CoA y la sinapoil-CoA, para la formación de muchos alcoholes cinamoil, que son los monómeros de la lignina, la suberina y otros compuestos fenólicos que se asocian con la pared celular (Hahlbrock y Grisebachi, 1979; Hahlbrock y Schell, 1989; Cukovic *et al.*, 2000). Los fenilpropanoides también constituyen los pigmentos de las flores, como los flavonoides y las antocianinas. Otros actúan como moléculas señalizadoras como el ácido salicílico y los factores de nodulación (Hahlbrock y Scheell, 1989). Según Dixon y Pavia (1995) los fenilpropanoides también se inducen como protectores bióticos y abióticos en condiciones de estrés. Por ejemplo, en condiciones de mucha luz y radiación UV se producen componentes que absorben la luz como las antocianinas, los flavonoides, los ésteres de sinapil, los isoflavonoides y el psoraleno. Otros funcionan como fitoalexinas y agentes alelopáticos. Con el ataque de patógenos se producen los pterocarpanos, las isoflavinas, los isoflavonoides, los stilbenos, las cumarinas, las furanocumarinas, las 3-deoxiantocianidinas, los flavonoides y los auronos. Con las heridas hay producción de cumestrol, cumarina, psoraleno, ácido clorogénico, ésteres de ferulato, ácidos fenólicos asociados a la pared celular, lignina, suberina. En temperatura baja y poco fósforo en el medio se produce antocianinas. En condiciones de escaso nitrógeno y hierro se producen flavonoides y ácidos fenólicos, respectivamente.

Por otro lado, la diferenciación celular ocurre también en situaciones de estrés (Hansberg y Aguirre, 1990). Los metabolitos secundarios también se producen cuando hay situaciones de estrés. Muchos metabolitos secundarios se derivan de los fenilpropanoides (Friend, 1985). En todos los casos la 4CL cataliza el punto de ramificación entre el metabolismo general de los fenilpropanoides. Particularmente, la enzima 4CL desempeña un papel clave en el flujo de carbono en diversas ramas del metabolismo de los fenilpropanoides

que sirve para realizar funciones importantes en el crecimiento y la adaptación a las perturbaciones ambientales (Ehrling *et al.*, 1999). Por lo tanto, la posición central de la 4CL en la vía general de los fenilpropanoides nos permite sugerir que las 4CL regulan el flujo de los componentes intermedios del metabolismo secundario, es decir, de los ésteres de CoA. Estos ésteres sirven como sustrato para diferentes vías (Hahlbrock y Scheel, 1989). Probablemente el producto de la enzima AfeA es un metabolito de este tipo, capaz de desencadenar la diferenciación celular, específicamente la conidiación. Por lo tanto, la inactivación de *afeA* impide la producción de este metabolito y entonces la conidiación disminuye y se retrasa; y provoca un fenotipo algodonoso.

La proteína AfeA se parece más a las 4CL-Lk que a las 4CL típicas (Fig. 9 A). Estas enzimas son una variación de las 4CL, ya que son muy parecidas a éstas, pero utilizan otros sustratos. Muchos sustratos de las 4CL-Lk son ácidos orgánicos como aminoácidos, ácidos cinámicos, ácidos benzoicos y ácidos grasos (Schneider *et al.*, 2005). Al analizar la secuencia de las 4CL-Lk y compararla con las 4CL se observa que tienen diferencias de aminoácidos en el sitio donde se une el sustrato. Esto apoya la idea de que comparten mecanismos de reacción comunes, pero que utilizan sustratos diferentes. Las 4CL-Lk de plantas contienen secuencias tipo I para el transporte al peroxisoma. Aunque la proteína AfeA no tiene estas secuencias peroxisomales (Fig. 8 y Fig. 9 B), se parece más a las 4CL-Lk que a las 4CL. El análisis *in silico* indica que AfeA es una proteína citoplasmática. Esto es consistente con el análisis tipo Western de las fracciones celulares de cepas de *A. nidulans* con AfeA marcada con el epítotope HA y revelado con un anticuerpo α HA (O. Sánchez, comunicación personal). En *A. nidulans*, al igual que en *A. fumigatus* y *A. oryzae* existen homólogos de AfeA que sí presentan secuencias para su localización peroxisomal (Fig. 8 y Fig. 9 B). Las proteínas peroxisomales tienen un tripéptido característico en el extremo carboxilo terminal o tienen una secuencia de nueve aminoácidos RLX5HL en el extremo amino terminal (Galagan *et al.* 2005). Estas proteínas son importantes porque en los

peroxisomas se realizan reacciones de degradación de los ácidos grasos o β oxidación. Los peroxisomas también funcionan para remover el peróxido de hidrógeno y en los mamíferos es el sitio donde realiza la síntesis del colesterol y de los ácidos biliares. En los hongos estas reacciones son críticas para el crecimiento, el metabolismo secundario y en la patogénesis. Sin embargo, en las plantas el cumarato se activa en el citosol y no se ha relacionado con el metabolismo peroxisomal de este ácido o de otros ácidos que se activen por la 4CL. La proteína AfeA podría catalizar la activación de CoA de compuestos estructuralmente relacionados, como el ácido cinámico y el ácido benzoico.

Los homólogos de AfeA en *A. nidulans*, podrían ser diferentes isoformas de las 4CL-Lk que utilizan diferentes sustratos. En las plantas como el álamo se piensa que hay diferentes isoformas de la 4CL (Allina *et al.*, 1998) que utilizan diferentes sustratos. También en *Arabidopsis thaliana* se han encontrado tres isoformas con distintas especificidades y diferente preferencia de sustrato (Ehrling *et al.*, 1999). Por ejemplo, la *At4CL1* y *At4CL2* participan en la formación de lignina y en la producción de otros compuestos fenólicos no flavonoides. Estas isoformas se expresan en tejidos vasculares. En cambio la isoforma *At4CL3*, participa en la síntesis de flavonoides y se expresa en las flores. Posteriormente se encontró la cuarta isoforma, *At4CL4*, que usa el sinapato como sustrato (Hamberger y Hahlbrock, 2003). Sin embargo, no todas las especies tienen varias isoformas. Por ejemplo, la papa *Solanum tuberosum* (Becker-André *et al.*, 1991) y el pino *Pinus taeda* (Zhang y Chiang, 1997) no poseen más que una isoforma.

Los flavonoides que son parte del metabolismo secundario se consideraban específicos de las plantas y algunas bacterias (Juvvadi *et al.*, 2005). Sin embargo, posteriormente se demostró la presencia de PAL en los basidiomicetes y en los ascomicetes, aunque en menos cantidad en comparación con las plantas. Por ejemplo, los basidiomicetes *Ustilago maydis* y *Amanita muscaria* presentan PAL (Hwan Kim *et al.*, 2001). Sin embargo en *U.*

maydis la interrupción del gene correspondiente, aparentemente no produce ningún fenotipo. También se encontró chalcona sintetasa en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Neurospora crassa* (Gensheimer y Mushegian, 2004), lo cual sugiere que tienen un metabolismo tipo flavonoides en hongos. Asimismo, en *A. oryzae* se han encontrado enzimas para la producción de flavonoides (Seshime *et al.*, 2005). La síntesis de flavonoides requiere la expresión coordinada de genes que codifican para varias enzimas. En *A. oryzae* se encontraron cuatro genes que codifican para la PAL al igual que en *A. thaliana*. Por su parte, *A. nidulans* tiene dos y *A. fumigatus* tiene uno (Juvvadi *et al.*, 2005). En cuanto a la 4CL, en el genoma de *A. oryzae* se encuentran once genes que pueden codificar para esta enzima; en *A. nidulans* ocho y en *A. fumigatus* dos. En *A. oryzae* también se han encontrado genes del metabolismo de los flavonoides y en general del metabolismo de los fenilpropanoides, aunque con una identidad muy baja, entre el 20 y el 30% con las plantas (Juvvadi *et al.*, 2005; Seshime *et al.*, 2005). También se han encontrado genes en *N. crassa* y en *S. cerevisiae* para la chalcona flavona isomerasa que es responsable de la ciclización de la chalcona en flavona (Gensheimer *et al.*, 2004). Incluso en *Aspergillus unilateralis*, una especie propia de Australia, se purificaron metabolitos como el ácido ferúlico y el ácido diferúlico (Capon *et al.*, 2004). Esto indica la capacidad de este hongo para sintetizar estos compuestos; alternativamente, indica la capacidad de poder degradar estos compuestos procedentes del medio donde crece que es el trigo. Todo lo anterior sugiere la existencia de un metabolismo tipo flavonoides en los hongos.

TmpA parece ser una oxido-reductasa de membrana que podría regular a AfeA y producir un metabolito secundario que regula la conidiación

TmpA y sus homólogos están presentes en los hongos y en las plantas, pero no se relacionan con proteínas de función conocida (Fig. 2 Soid-Raggi *et al.*, 2006). Nosotros sugerimos que TmpA es una proteína que se encuentra

embebida en la membrana plasmática. ya que en análisis *in silico* se predice la existencia de dominios transmembranales. Esta arquitectura se encuentra en todos sus homólogos, ya que se conservan la posición y número de dominios transmembranales. Esto se apoya también porque en fusiones de TmpA-GFP, no obstante que no se observa fluorescencia en el septo que presentan las hifas, sí se observa mayor fluorescencia en la periferia de las esporas (Fig. 3 Soid-Raggi *et al.*, 2006).

Algunos de los homólogos de TmpA presentan un dominio de reductasas de hierro que comparten las mismas hierro reductasas y las NADPH oxidasas (Lara-Ortiz *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2005). Sin embargo, TmpA no parece estar relacionada a la adquisición del hierro porque las mutantes $\Delta tmpA$ crecen en bajo hierro, producen cantidades normales de sideróforos y sus defectos en la conidiación no se remedian al añadir sideróforos (dato no mostrado). Las reductasas de hierro y las NADPH oxidasas toman electrones del NADPH en el citoplasma y los transfieren a través de la membrana, vía FAD a un grupo hemo y de ahí al oxígeno. TmpA presenta un sitio probable para la unión de NADPH y de FAD, por lo cual es una flavoproteína (Fig. S1A y B Soid-Raggi *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo presenta una histidina de las cuatro histidinas que normalmente presentan estas proteínas (Fig. S2 Soid-Raggi *et al.*, 2006). Además presenta otra histidina que solo se conserva en los homólogos de TmpA. No obstante, una sola histidina podría coordinar al ion hierro como sucede en las peroxidasas y otras oxidasas. Además existen algunas flavoproteínas, como las mono-oxigenasas que funcionan en una manera similar y que carecen de hemos (Dym y Eisenberg, 2001). Por lo tanto, TmpA puede ser una oxidoreductasa de membrana que regula la conidiación. Una posibilidad es que TmpA al presentar cambios con un estado redox se puede inducir un cambio conformacional que altere su actividad y así pueda participar en la modificación oxidativa de otras proteínas. Además hay oxidoreductasas, metilasas, acetilasas y las esterases que participan en el metabolismo secundario. Una indicación de esta función es que sus genes se encuentran

adyacentes a genes del metabolismo secundario (Keller *et al.*, 2005). Este podría ser el caso de *TmpA* y *AfeA*. *TmpA* podría ser una NADP oxidoreductasa que reduzca u oxide el producto de *AfeA*, como por ejemplo el éster del ácido cinámico. Por su parte, la función de *AfeA* parece estar relacionada más directamente con el metabolismo secundario. Por lo tanto, su papel podría ser catalizar la esterificación de algún derivado de un ácido fenólico y producir algún metabolito crítico para la conidiación.

Actualmente se sabe que los metabolitos secundarios productos de los hongos y las plantas, en los mamíferos actúan facilitando la eliminación y la desintoxicación de cancerígenos presentes en el organismo. Esto lo hacen modulando la acción de ciertas enzimas. Otros metabolitos actúan como antioxidantes neutralizando los radicales libres, causantes de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis. Se podría hacer una analogía con que una de las características de las mutantes algodónosas es que son invasivas (Dorn, 1970). Debido a ésto, a estas mutantes se les ha comparado con células cancerígenas. De esta forma, las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$ al carecer de antioxidantes o no producir metabolitos secundarios tienen problemas en la diferenciación. Por lo tanto, las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$ podrían ser como células cancerosas, incapaces de eliminar agentes nocivos o neutralizar radicales libres.

Los genes *tmpA* y *afeA* participan en la activación de *brlA*, en la conidiación y en el crecimiento

Las mutantes en los genes *afeA* y *tmpA* esporulan en menor cantidad que una cepa silvestre y muestran gran proliferación de hifas no diferenciadas. Asimismo tienen baja expresión del gen regulador de la conidiación, *brlA* (Fig. 4 A Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 11). Esto indica que estos genes se requieren para la expresión de *brlA* y que se expresan tempranamente para activar a *brlA*.

Además, el tamaño de la colonia de estas mutantes es mayor con respecto al de una cepa silvestre. Una posible explicación es que otra función del gen *brlA* es inhibir el crecimiento de la colonia. Por lo tanto las mutantes *afeA* y *tmpA*, al expresar al gen *brlA* tardíamente y en menor proporción, no presentan una inhibición en el crecimiento.

Sin embargo, estas mutantes, como todas las mutantes *fluffy* no son aconidiales y conidian, aunque en menor proporción y tardíamente, en comparación a una cepa silvestre. Otras mutantes algodonosas, incluso con el fenotipo más acentuado, también conidian en algunas condiciones ambientales, como es el caso de mutantes en los genes *flbA* y *fadA*^{G42R} (Lee y Adams, 1994; Yu *et al.*, 1996). Incluso en algunas de ellas, como en las mutantes en el gen *fluG*, se puede anular el fenotipo en ciertas condiciones, como es la alta osmolaridad (Wieser *et al.*, 1994). Esto indica que debe haber varios caminos para activar a *brlA*.

Los genes *tmpA* y *afeA* se expresan en niveles similares en el desarrollo, pero aumentan en carencia de nitrógeno

Los genes *tmpA* y *afeA* son necesarios para la esporulación, sin embargo se expresan a niveles constantes a lo largo del desarrollo (Fig. 4 B Soid-Raggi *et al.*, 2006 y Fig. 12). Esto sugiere que el mRNA de estos genes se expresa a un nivel basal y que se requiere de los productos de otros genes para activar a *brlA* y alcanzar el nivel necesario para la conidiación. La regulación de *afeA* y *tmpA* debe ser principalmente a nivel post-transcripción al y post-traducciona. Sin embargo, no se ha observado que las 4CL nunca tengan modificaciones post-traduccionales. A diferencia, en las PAL si se conoce que se modifican post-traduccionalmente, ya que se fosforilan en la treonina 545 (Allwood *et al.*, 1999). La expresión de *afeA* a lo largo del desarrollo de *A. nidulans* contrasta con el comportamiento de los genes que codifican para las 4CL o 4CL-Lk. Estos genes

en las plantas tienen una expresión diferencial durante el desarrollo, de acuerdo al tejido o estructura y de acuerdo al estrés ambiental. Por ejemplo, en la flor del tabaco *Nicotiana sylvestris*, un gen con gran similitud a las 4CL-Lk, se expresa en las gemas de las flores en un período corto durante el desarrollo (Varbanova *et al.*, 2002). Asimismo, en *A. thaliana* la expresión de las isoformas de las 4CL varía de acuerdo al órgano de la planta (Ehlting *et al.*, 1999). Sin embargo, la regulación del metabolismo secundario es muy compleja y puede involucrar además de una activación transcripcional, el procesamiento y la estabilidad del mRNA, así como una activación o inactivación de la actividad enzimática.

En las plantas, las condiciones de estrés como la infección por microorganismos, las heridas o la radiación ultravioleta provocan un incremento en la expresión de las 4CL (Ehlting *et al.*, 1999). De manera similar, este comportamiento también se observa en la expresión de *tmpA* y *afeA* que se incrementa en carencia de fuente de nitrógeno (Fig. 4 C Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 13). Este comportamiento también sucede con la enzima PAL en una levadura roja *Rhodospodium toruloides*, en la cual la enzima se induce en esta condición. No obstante en esta levadura, la PAL también se induce en carencia de fuente de carbono (Marusich *et al.*, 1981). El comportamiento de *tmpA* y de *afeA* es semejante al de la PAL de *Neurospora crassa* que se induce por carencia de fuente nitrógeno, pero no de fuente de carbono (Sikora y Marzluf, 1982). Sin embargo, en otros organismos como en *Solanum tuberosum* el RNA mensajero de la PAL se acumula en niveles similares independientemente del tipo de estímulo que se aplique (Becker-André *et al.*, 1991). Los resultados de que *tmpA* y *afeA* se requieren para esporular en respuesta a la carencia de nitrógeno (Fig. 5 A Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 14 A) y de que la carencia de nitrógeno induce la expresión de ambos genes son compatibles entre sí. Al no haber nitrógeno, estos genes se inducen, pero si se impide su expresión en estas condiciones, no se pueden inducir y no ocurre esporulación. Por otra parte, en condiciones de carencia de fuente de nitrógeno, en las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$, aunque no hay esporulación, hay cierta expresión de *brlA* (Fig. 5

B Soid-Raggi *et al.*, 2006 y Fig. 14 B). Esto sugiere que se requiere sobrepasar cierto umbral de expresión de *brlA* para que la esporulación ocurra.

Los genes *tmpA* y *afeA* probablemente se encuentran en una misma vía

Durante el ciclo asexual se observa mayor expresión del gen *brlA* en la mutante $\Delta afeA$ que en la mutante en el gen *tmpA* (Fig. 4 A de Soid-Raggi *et al.*, 2006 y Fig. 11). Una posibilidad es que *tmpA* y *afeA* se encuentren en la misma vía. En este concepto, probablemente *tmpA* está antes que *afeA*, es decir, en la mutante *tmpA* se inhibe la vía desde el inicio, por lo que la expresión de *brlA* es más baja. En este caso, en la mutante *afeA*, se debería expresar *tmpA*, se enciende la vía y después se inhibe la vía al no haber *afeA*. Otras características que apoyan que *tmpA* y *afeA* se encuentran en la misma vía es que tienen un comportamiento similar. Por ejemplo, ambos genes se requieren para esporular y se inducen en carencia de fuente de nitrógeno. Otro comportamiento similar es que, a diferencia de las mutantes $\Delta fluG$, las mutantes $\Delta afeA$ y mutantes $\Delta tmpA$ acumulan ácido orsonorílico (dato no mostrado). Este compuesto es un precursor de la esterigmatocistina que fluoresce con la luz ultravioleta (Butchko *et al.*, 1999). Además en cromatografía en capa fina hemos visto que ambas mutantes producen esterigmatocistina (dato no mostrado). El hecho de que *afeA* y *tmpA* se comporten de manera semejante sugiere que ambos genes se encuentran en la misma vía (Fig. 21). Asimismo, datos preliminares, sugieren que *tmpA* no se expresa en una cepa $\Delta afeA$ lo que sugiere nuevamente que estos genes comparten la misma vía (dato no mostrado). Para confirmar ésto, es necesario sobre-expresar *afeA* en una cepa silvestre y analizar si su sobre-expresión es suficiente para que ocurra esporulación en medio líquido. De la misma manera, es importante sobre-expresar *afeA* en un fondo genético $\Delta tmpA$ y observar si hay esporulación en medio líquido. Si esporula, indicaría que no están en la misma vía o que están en la misma vía y *tmpA* se encuentra antes que *afeA*. Esta segunda idea

también es posible porque el gen *tmpA* probablemente codifica para una proteína transmembranal y el gen *afeA* una proteína citoplasmática. De esta forma, TmpA al ser transmembranal podría tener contacto con la señal extracelular del exterior y actuar antes que AfeA. Sin embargo, datos preliminares sugieren que en una mutante *afeA* tampoco se expresa *tmpA* (dato no mostrado). Esto sugeriría que *afeA* es necesario para la expresión de *tmpA*. Esto a su vez indicaría que *afeA* está antes de *tmpA* en la vía de esporulación. Alternativamente, podría existir una coregulación entre ambos genes donde cada uno se requiera para la expresión del otro. La sobre-expresión de *tmpA* induce la esporulación en medio líquido (Fig. 6 Soid-Raggi *et al.*, 2006). Para confirmar si ambos genes se encuentran en la vía se requiere sobre-expresar *tmpA* en un fondo genético $\Delta afeA$. Si *tmpA* está antes de *afeA* no ocurrirá esporulación.

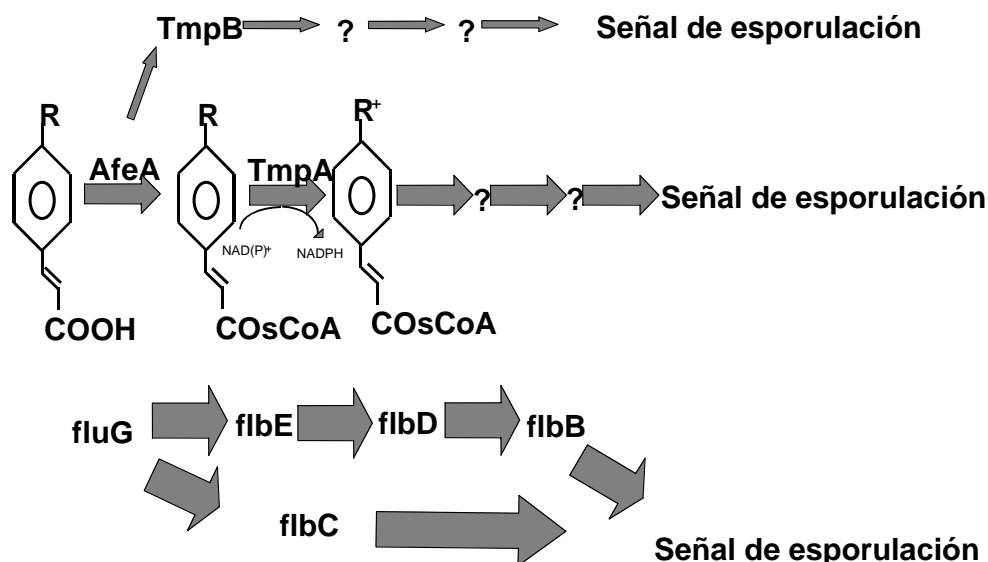


Figura 21. Modelo de las tres vías independientes que regulan la conidiación en *Aspergillus nidulans*. La vía de TmpB que sugerimos que controla aproximadamente el 10% de la esporulación (flechas delgadas) se interrelaciona con AfeA. La vía de AfeA/TmpA sugerimos que controla aproximadamente el 30% de la esporulación (flechas medianas). El sustrato probable de AfeA es un ácido benzoico, un compuesto fenólico o un ácido graso que se oxida (o reduce) por TmpA una probable flavoproteína de membrana. La vía de FluG es la más importante de la conidiación, sugerimos que controla aproximadamente el 60% de la esporulación (flechas gruesas).

En datos preliminares una mutante doble $\Delta afeA$, $\Delta tmpA$ esporula igual que una mutante sencilla en cualquiera de los dos genes (O. Sánchez, comunicación personal), lo cual sugiere que los dos genes forman parte de una misma vía (Fig. 21). La proteína TmpB es el homólogo de TmpA que tiene un dominio de adenilación. Las mutantes sencillas $\Delta tmpB$ son casi silvestres, sin embargo las mutantes dobles $\Delta tmpB$; $\Delta tmpA$ son más algodonosas que las mutantes sencillas en cada uno de estos genes, lo cual sugiere que *tmpB* y *tmpA* están en diferente vía (J.L. Ramos, comunicación personal) (Fig. 21) (ver más adelante). Sorprendentemente, mutantes $\Delta tmpB$, $\Delta afeA$ esporulan igual que las mutantes sencillas, lo cual sugiere que *tmpB* y *afeA* están en la misma vía (J.L. Ramos, comunicación personal). Por lo tanto, esto indicaría que *afeA* y *tmpA* no están en la misma vía. Alternativamente, *tmpB* forma parte de una vía independiente, pero en un punto se relaciona con *afeA* (Fig 21). Posiblemente, *tmpA* y *tmpB* se requieren individualmente, pero son parcialmente redundantes en un punto. Las mutantes $\Delta tmpA$ esporulan en el centro que es donde se inicia la esporulación y son algodonosas en la periferia que es donde ocurre la esporulación tardía; las mutantes dobles $\Delta tmpB$, $\Delta tmpA$ son muy algodonosas en el centro y en la periferia. Por lo tanto, el gen *tmpB* probablemente se requiere para la esporulación temprana y el gen *tmpA* para la esporulación tardía.

Los genes *tmpA* y *afeA* se encuentran en una vía independiente de *fluG*.

En medio sólido, las mutantes simples en *tmpA* y *afeA* expresan el gen *brlA* en niveles por debajo del 5% (Fig. 4 A Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 11). Sin embargo, si ocurre la conidiación. Esto indica que hay varias vías que activan al gen *brlA*. Esto también se deduce ya que al sobre-expresar el gen *fluG* en una mutante *tmpA* o en una mutante *afeA* hay esporulación (Fig. 7 A, Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 15). Una posible explicación es que estos genes se encuentren en la misma vía de *fluG*, río arriba de *fluG*. Otra posibilidad es que *tmpA* y *afeA* formen parte de una vía independiente de *fluG*. Para ver cual de las dos

posibilidades es correcta se obtuvieron mutantes dobles $\Delta afeA$, $\Delta fluG$ y $\Delta tmpA$, $\Delta fluG$ (Fig. 7 B y C, Soid-Raggi *et al.*, 2006; Fig. 16, A y B). Encontramos que estas mutantes dobles son más algodonosas que una sencilla, lo cual también se observa en que producen muy pocas esporas. Esto indica que *tmpA* y *afeA* no forman parte de la vía de *fluG*, sino que se encuentran en una vía independiente (Fig. 21).

Hasta el momento solo la sobre-expresión de *fluG* o de *flbD* causa la formación de conidióforos completos. Por el contrario, la sobre-expresión de *flbA* o de *tmpA* causa la producción de conidióforos reducidos. Esto probablemente se puede explicar si vía de *fluG* es la vía más importante para la conidiación (Fig. 21).

***tmpB*: una tercera vía de la esporulación**

En *A. nidulans* la proteína TmpA tiene un homólogo que es muy similar en su carboxilo terminal. Este homólogo tiene un dominio de adenilación del tipo de las péptido sintetasas no ribosomales en su extremo amino terminal. Esta proteína la llamamos TmpB y es idéntica a la proteína AN9129 del Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/>). Para conocer si TmpB desempeña una función en la conidiación, se realizó la interrupción de su gen y se observó que la cepa mutante tiene un fenotipo casi silvestre, pero reduce el número de esporas en un 50% (J.L. Ramos, comunicación personal). Sin embargo, la mutante doble $\Delta tmpA$, $\Delta tmpB$ es muy algodonosa (J.L. Ramos, comunicación personal). Esto indica que los genes *tmpA* y *tmpB* están en vías diferentes (Fig. 21). Esto se confirma porque una mutante triple *tmpA*, *tmpB*, *fluG* es totalmente aconidial (J.L. Ramos, comunicación personal). Esta mutante triple no conidia ni en medio con baja glucosa, ni en sorbitol, ni en ambos aún después de 6 días de incubación. Por lo tanto, ésto sugiere que *tmpB* define una tercera vía, independiente de *tmpA/afeA* y de *fluG*, que regula la conidiación

(Fig. 21). Esto explica porque las mutantes dobles, $\Delta fluG;\Delta tmpA$ y $\Delta fluG;\Delta afeA$, aunque son muy algodonosas, sí esporulan ligeramente (Fig. 7 B y C Soid-Raggi *et al.*; Fig. 16 A y B).

TmpA y AfeA producen señales extracelulares que regulan la esporulación

Los genes *tmpA* y *afeA* junto con el gen *fluG* son los primeros genes que se conocen que codifican para enzimas que parecen participar en la producción de factores extracelulares que regulan la conidiación (Fig. 17-19 y 21). La producción de estos factores posiblemente tiene ventajas evolutivas, ya que al ser una cepa incapaz de esporular, otra cercana puede producir estos factores y así desencadenar la esporulación que es una manera de sobrevivir ante condiciones adversas.

Previamente se habían aislado cepas mutantes que son incapaces de responder a estímulos inductores de la conidiación y son defectuosas en el proceso temprano de esporulación (Butnick *et al.*, 1984). Estas mutantes producen en mayor cantidad un grupo de compuestos fenólicos, cuya estructura no se ha identificado. Solamente se identificó un compuesto antibiótico que se llama éter 3,3'-dihidroxi-5,5'-dimetil difenílico o diorcinol. Este compuesto es un derivado del ácido orselínico que participa en la síntesis de varios metabolitos secundarios en los hongos. Esto sugiere que la vía de los compuestos fenólicos participa en la iniciación de la conidiación. Esta deficiencia en la conidiación podría ser por falta de algún factor esencial para la conidiación o por un exceso de algún factor inhibidor de la conidiación. O bien por ambas, ya que estas dos posibilidades no son excluyentes. Sin embargo en estas mutantes no se identificó el gene que tenían afectado.

Aunque no se conoce la naturaleza química del factor en la que participa FluG, se conoce que es un derivado del 2-metil-butadieno, es decir, un terpeno. En el caso de los productos que sintetizan TmpA y AfeA tampoco se conoce la

naturaleza química de los compuestos que producen, pero al parecer son compuestos más estables que el que produce FluG. Esto creemos, porque mientras que con un medio usado por una silvestre, no ha sido posible complementar a una mutante *fluG* (Lee y Adams, 1994). A diferencia, al crecer en medio usado por una cepa silvestre a mutantes $\Delta afeA$ (Fig. 19 C) o $\Delta tmpA$ (dato no mostrado) hay una complementación parcial de estas mutantes. Esta complementación no se observa al inocular una mutante $\Delta afeA$ o $\Delta tmpA$ en un medio usado por una mutante $\Delta afeA$ (Fig. 19 B) o $\Delta tmpA$ (dato no mostrado), respectivamente. Por lo que la posibilidad de que esta complementación se deba a la carencia de nutrientes, como la glucosa, es escasa. Sin embargo, los compuestos que producen AfeA y TmpA tampoco son compuestos muy estables. La producción de estos compuestos depende de muchos factores como la densidad celular y el tiempo. La complementación extracelular se observa mejor en medio con 0.1 M de fosfatos, que tiene 10 veces más de fosfatos de lo que normalmente tiene el medio mínimo. A este medio se le llama medio mínimo de Martinelli (1976). Este comportamiento ocurre porque se conoce que cuando no hay cambio en el medio después de 18 horas de incubación en medio líquido mínimo de Käfer (Hill y Käfer) hay una alcalinización de este medio. Esto produce una menor inducción de *brlA* y, por lo tanto, no ocurre esporulación. En cambio, con el medio mínimo de Martinelli no hay alcalinización y el pH se mantiene estable, alrededor de 6.5, y entonces el gen *brlA* se induce mejor (Skromne *et al.*, 1995). Como se explicó anteriormente, no hay complementación al poner juntas a dos mutantes $\Delta tmpA$ o a dos mutantes $\Delta afeA$ en medio mínimo de Käfer o en medio mínimo de Martinelli. Esto indica que los genes *tmpA* y *afeA* producen una señal extracelular que desencadena la esporulación. Las mutantes en estos genes no producen esta señal y por eso son algodonosas. Al poner a estas mutantes junto a una cepa silvestre, la cepa silvestre es capaz de pasar la señal extracelular a estas mutantes y entonces ocurre esporulación.

Existen otras mutantes algodonosas y no algodonosas que están afectadas en otros genes que también regulan la conidiación

Se han aislado mutantes algodonosas que tienen una expresión media (aproximadamente 25% con respecto a una cepa silvestre) y alta (cercana a la Silvestre) de *brlA*, mutantes FMB y FHB, respectivamente (Wieser *et al*, 1994). Estos genes no se han estudiado y pueden definir otras vías que son importantes para el desarrollo. Además de estos genes, puede haber otros genes implicados en el desarrollo, cuya mutación cause un fenotipo diferente al algodonoso. Algunos de estos genes que participan en el desarrollo podrían ser esenciales y, por lo tanto, las mutantes ser letales. Por otra parte, si hay genes importantes en el desarrollo que su función sea redundante, su mutación no causaría defecto en el desarrollo. Además, existen otras mutantes que se comportan de manera contraria a las mutantes afectadas en los genes *flbA-E*, *fluG*, *tmpA* y *afeA* que continúan creciendo y no esporulan después de sobre-expresar a *brlA*. Algunas de estas mutantes definen cuatro *loci* nuevos y se les llamó *sbrA-D* y parecen estar afectadas en un modificador del desarrollo (Marhoul y Adams, 1997). Por lo tanto, la regulación de la conidiación debe ser un proceso muy complejo y sólo conocemos una parte de éste.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

- El comportamiento fenotípico de la mutante *fluffy* que se obtuvo por REMI es debido a la mutación del gen *tmpA* que no se conocía previamente. El gen *tmpA* codifica para una proteína que define una nueva familia de flavoproteínas de membrana presentes en los hongos y en las plantas. El gen *afeA* se encuentra contiguo a *tmpA* y, predice una proteína citoplasmática, miembro de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato (acilo-AMP transferasas), específicamente se parece a una enzima tipo cumarato ligasa (CL-Lk).
- Los genes *tmpA* y *afeA* se requieren para la expresión de *brlA* y la conidiación. La expresión de ambos genes permanece relativamente constante durante el crecimiento y el desarrollo asexual, pero se incrementa en condiciones de privación de fuente de nitrógeno. A su vez, estos genes se requieren para la esporulación en respuesta a la privación de fuente de nitrógeno, pero no de fuente de carbono.
- El fenotipo semejante de las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$ y de la mutante doble $\Delta tmpA$, $\Delta afeA$ sugiere que estos genes funcionan en una misma vía, que es independiente de la vía de esporulación de *fluG*. Por lo tanto, estos genes definen una segunda vía que regula la conidiación. El fenotipo completamente aconidial de una mutante triple $\Delta fluG$; $\Delta tmpA$, $\Delta afeA$ indica que el gen *tmpB* define una tercera vía de conidiación.
- Los defectos en las mutantes $\Delta tmpA$ y $\Delta afeA$ se suprimen al crecerlas junto a una cepa silvestre o junto a otras mutantes con fenotipo *fluffy*. Por

lo tanto, el gen *tmpA* probablemente codifica para una oxidoreductasa de membrana que participa en la síntesis de una señal regulatoria de conidiación. El gen *afeA* posiblemente participa en la síntesis de un compuesto tipo cumaril-CoA que también induce la conidiación.

VII. PERSPECTIVAS

- Determinar si la proteína TmpA une FAD, NADPH y si las histidinas conservadas son esenciales para su función, mediante mutagénesis sitio-dirigido y/o ensayos bioquímicos.
- Sobre-expresar el gen *afeA* y conocer sus efectos en cultivo sumergido.
- Conocer las relaciones epistáticas entre *afeA* y *tmpA*, generando mutantes dobles y sobre-expresando *afeA* en un fondo genético $\Delta tmpA$ y/o viceversa.
- Determinar la localización celular de AfeA mediante fusiones genéticas entre AfeA y las proteínas fluorescentes GFP o mRFG.
- Determinar la relación entre AfeA y TmpA y otras funciones homólogas de plantas, involucradas en la vía de los fenilpropanoides tales como las policétido sintetasas.

VIII. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Cepas

Tabla I. Cepas que se utilizaron en este trabajo.

Cepa	Fuente
RMS011 <i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>	M. Stringer (USA)
*TGS1, TGS2, TGS3, TGS4, TGS5 <i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔafeA::argB, veA1</i>	Este trabajo. RMS011 transformada con pGS15
BL001 <i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔtmpA::pDC1, veA1</i>	Sánchez <i>et al.</i> , 1998; Soid-Raggi <i>et al.</i> , 2006
MH1164 <i>yA2, suadE20, adeE20; amdS-Δ223; amdA7; riboB2, veA1</i>	M. Hynes (Australia)
CGS1 y CGS2 <i>biA1; ΔargB::trpCΔB; metG1; trpC801, ΔtmpA::pDC1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de BL001 X MH1164 (Soid-Raggi)
CGS3 <i>biA1, ΔargB::trpCΔB; riboB, trpC801, ΔtmpA::pDC1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de BL001 X MH1164 (Soid-Raggi).
CGS5 <i>biA1, ΔargB::trpCΔB; metG1; riboB, trpC801, ΔtmpA::pDC1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de BL001 X MH1164 (Soid-Raggi)
TGS6 <i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔtmpA::argB, veA1</i>	Soid-Raggi <i>et al.</i> , 2006
TJA22 <i>biA1; metG1; brlA::lacZ::argB, veA1</i>	Aguirre, J., 1993
CGS17 <i>biA1; brlA::lacZ::argB, ΔargB::trpCΔB; metG1; trpC801, ΔafeA::argB, veA1</i>	Este trabajo, progenie de TGS1 X TJA22
TBN68.11 <i>pabaA1, yA2; alcA(p)::ΔN(1-423)fluG::trpC; veA1</i>	T. Adams (USA)
CGS41 <i>pabaA1, yA2; alcA(p)::ΔN(1-423)fluG::trpC; ΔafeA::argB, veA1</i>	Este trabajo, progenie de TBN68.11 X CGS17
RBN119 <i>biA1, yA2; ΔfluG::trpC, argB2; metG1; veA1</i>	Wieser y Adams, 1995
CGS34 <i>pabaA1, yA2; ΔfluG::trpC; ΔafeA::argB, veA1</i>	Este trabajo, progenie de RBN119 X TGS1
CLK43 <i>pabaA1, yA2; veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 2002
CGS49 <i>pabaA1, yA2; ΔfluG::trpC; veA1</i>	Soid-Raggi <i>et al.</i> , 2006
FGSC26 <i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center, USA
TJH3.40 <i>biA; wA3; metG1, ΔstcE::argB; veA1</i>	Butchko <i>et al.</i> , 1999
CGS28 <i>pabaA1; wA1; metG1; ΔstcE::argB; ΔafeA::argB, veA1</i>	Este trabajo, progenie de THH3.40 X TGS1
CJA16 <i>biA1; metG1, ΔflbB; veA1</i>	J. Aguirre (México)
TJW30.1 <i>pabaA1, yA2; flbD::trpC, trpC801, veA1</i>	Wieser y Adams, 1995

Interrupción del gen *afeA*

Para generar una mutante que tuviera cancelado el gen *afeA* se diseñó una estrategia semejante a la que se utilizó para *tmpA*, es decir, se quitó parte del gen *afeA* y se reemplazó por el gen *argB*. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos fluX27 ATACCCGGGAGCAAATCAAAAAGAAG y fluX28 ACTGTCGACAATGGGTCTGTGGGAGTG con un sitio *SmaI* y *Sall*, respectivamente. Se utilizó el cósmido W19A10 como templado y por PCR se amplificó un fragmento de 2.3 kpb. El PCR se realizó con la Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, California) con 2 mM MgCl₂. Se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 55°C por 45 segundos y un tiempo de extensión de 2 minutos a 72°C durante 35 ciclos. El producto de PCR que se obtuvo se clonó en el plásmido pCRII (Invitrogene) para generar el plásmido pGS13. El pGS13 se digirió con *SmaI* y *Sall* para recuperar el inserto y se clonó el inserto en BSKSII cortado con *SmaI* y *Sall* para generar el plásmido pGS14. El gen *argB* se obtuvo al digerir el plásmido pDC1 con *SphI* y *EcoRI*. Para interrumpir a *afeA*, el plásmido pGS14 se digirió con *SphI* y *EcoRI* y se ligó con el fragmento *argB*. Esto originó el plásmido pGS15 que se linealizó con *NotI* y se utilizó para transformar a la cepa RMS011. Las transformantes que se obtuvieron se analizaron por Southern blot al digerir su DNA genómico con *BstXI*, *NcoI* y *SphI* por separado, e hibridar con el fragmento *SmaI-XbaI* del pGS13 que se utilizó como sonda específica para *afeA* y el fragmento *SphI-EcoRI* del pDC1 que se utilizó como sonda específica para *argB*.

Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

Para realizar digestiones dobles con enzimas de restricción que requieren condiciones diferentes, la primera enzima de restricción se eliminó con el sistema Wizard DNA Clean-Up (Promega, Madison). Para remover enzimas de

restricción de fragmentos mayores a 10 kpb se realizaron extracciones con fenol cloroformo. Los fragmentos de DNA se purificaron de los geles de agarosa por GENE CLEAN kit (Bio 101 Inc, California) o QIAquick Gel Extraction Kit (Life Sciences, Hilden). Los fragmentos de DNA mayores a 10 kpb se purificaron por fibra de vidrio. Las estrategias para realizar la clonación de fragmentos en plásmidos, las reacciones de ligación y la desfosforilación de plásmidos se realizaron según Sambrook *et al.*, (1989).

Las células competentes de las cepas XL1-Blue (STRATAGENE, California) y DH5 α (Life Technologies) de *Escherichia coli* se prepararon según Inoue *et al.*, (1990). Las transformaciones de *E. coli* y las minipreparaciones de los plásmidos se llevaron a cabo según Sambrook *et al.*, (1989).

El DNA genómico se aisló como se reportó previamente (Timberlake, 1980) y los cósmidos y plásmidos se purificaron por QUIAGEN Plasmid Kit (Life Sciences) o por Wizard Plus DNA Purification System (Promega). Ambos se fraccionaron en geles de agarosa al 0.7% con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. El RNA total se aisló con el reactivo de Trizol (Life Sciences) y se separó en geles de agarosa al 1%, MOPS 100 μ M con formaldehído al 37%. Ambos se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N y se hibridaron con sondas específicas marcadas con 32 P por random primer (Invitrogen). El cDNA de *afeA* se obtuvo por el método 3'RACE (Invitrogen) utilizando los oligonucleótidos UAP y fluX19 (ACTATTGCCACTTCTGC).

Medios, transformación y condiciones de crecimiento

Todas las cepas se crecieron en medio mínimo de Käfer sólido o líquido con nitrato y 1% de glucosa con los suplementos correspondientes (Hill y Käfer, 2001) a 37°C. Para colectar las esporas de las mutantes algodonosas, estas mutantes se inocularon a confluencia en este mismo medio, pero con 0.1 % de

glucosa. Para las transformaciones de *A. nidulans* se obtuvieron protoplastos y se les añadió PEG 4000 al 60% según Yelton (1984).

Para los cultivos conidiantes y los experimentos de carencia nutricional se crecieron esporas por cinco días y se lavaron con agua cuatro veces en la centrifuga clínica. Con estas esporas se inocularon cultivos líquidos a una concentración de 5×10^5 esporas por ml. Los cultivos se crecieron 18 horas en un agitador rotatorio a 300 rpm. Para inducir la conidiación, porciones de cultivo de 50 ml se filtraron con una bomba de vacío y se expusieron al aire sobre papel filtro circular Whatman No. 1 de 10 cm de diámetro (Aguirre, 1993; Law y Timberlake, 1980). Los papeles filtros con el micelio adherido se transfirieron a charolas con medio sólido cubiertas con papel aluminio formando una curvatura de manera que el aire circulara libremente. Para los experimentos de carencia nutricional un cultivo único se dividió en cultivos de 50 ml. Transcurridas 18 horas, los cultivos se filtraron por tela Miracloth (Calbiochem, Darmstadt) y se enjuagaron con 1 volumen de medio mínimo sin glucosa o sin nitrato, previamente calentado a 37°C y agitado. Posteriormente, se incubaron en un medio sin glucosa o sin nitrato en las mismas condiciones de agitación y temperatura (Skromne *et al.*, 1995). Para los experimentos de sobre-expresión, las esporas se colectaron como se mencionó arriba, se inocularon en 50 ml a una densidad 1×10^6 esporas por ml en medio mínimo y se crecieron por 14 horas (Wieser y Adams, 1995). Después de este el tiempo el micelio se filtró y se lavó dos veces con el mismo volumen de medio mínimo sin glucosa y se transfirió a medio mínimo sin glucosa con 100 mM de treonina y se incubó en las mismas condiciones durante 12 horas. Para ver la acumulación de ácido norsolorínico las cepas se crecieron en medio de avena al 1% con los suplementos adecuados y las cajas de Petri se observaron al revés con luz ultravioleta.

Para contar las esporas de las cepas silvestres y de las mutantes simples y dobles, estas cepas se inocularon por triplicado, se crecieron por cinco días y

después se rasparon con Tween 80 al 0.1%. Este raspado se repitió varias veces hasta asegurarse de que no quedaran esporas en las cajas de Petri. Esta solución de esporas se vertió en tubos Falcon de 10 ml y se centrifugó por 10 minutos en el número 5 de una centrifuga clínica 1EC. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Este sobrenadante se volvió a centrifugar varias veces hasta asegurarse de que no quedaran esporas en el medio. Las esporas se diluyeron según la cantidad y se contaron en una cámara de Neubauer.

Para realizar los ensayos de complementación extracelular se utilizaron a las cepas con esporulación silvestre con esporas verdes o amarillas y a las mutantes $\Delta afeA$ con esporas verdes o amarillas. Estas cepas se crecieron por punto en medio sólido durante 18 horas. Después de ese tiempo se cubrieron con una membrana de filtración (Millipore, Massachusetts) isopore con un tamaño de poro de 0.4 μm y encima se inoculó la otra cepa. Se observaron a las 72 horas. Para los experimentos de medio usado las mismas cepas se inocularon en cajas de Petri con medio líquido y se crecieron por 24 horas. Después se extrajo el micelio y se filtró el medio con una membrana de Millipore estéril con un tamaño de poro de 0.22 μm . En ese medio se inoculó la otra cepa en cajas de Petri y se incubaron a 37°C en condiciones estacionarias durante 25 y 45 horas.

Actividad β -galactosidasa, Genética y Microscopía

La actividad de β -galactosidasa se determinó según lo reportado (Miller, 1972; Aguirre *et al.*, 1990; Skromne *et al.*, 1995). Para la obtención de diploides, haploides, dobles mutantes y fusiones se utilizaron técnicas convencionales (Pontecorvo *et al.*, 1953; Clutterbuck, 1969). Las microfotografías se tomaron

con una cámara digital Sony DSCF-717 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse E600 o Nikon SMZ1000.

Cromatografía en capa fina

Para realizar la extracción de componentes se crecieron cultivos líquidos de 50 ml por 2.5 días a 37°C a 300 rpm y se le agregó el mismo volumen de acetona y cloroformo (1 a 1). Se dejó esta extracción por un día completo, agitando vigorosa y manualmente aproximadamente cada hora. Después se dejó que se formaron las dos fases, se tomó la fase inferior, es decir, el cloroformo y se colocó en un vaso de precipitado. Las muestras se dejaron evaporar en la campana de extracción por dos días. Después de evaporarse se resuspendió en 500 μ l de cloroformo y se tomaron 15 μ l de esta muestra para aplicar a cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) de 6 cm de alto. Se separaron con cloroformo hasta que el solvente alcanzó la parte superior y se observaron con luz ultravioleta.

IX. REFERENCIAS

- Adams, T.H., Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362.
- Adams, T.H., Deising, H. y Timberlake, W.E. (1990) *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol Cell Biol* **10**: 1815-1817.
- Adams, T.H., Hide, W.A., Yager, L.N. y Lee, B.N. (1992) Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **12**: 3827-3833.
- Adams, T.H., Wieser, J.K. y Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35-54.
- Aguirre, J., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. (1990) Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp Mycol* **14**: 290-293.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* **8**: 211-218.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D. y Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111-118.
- Allina, S.M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D.A., Ellis, B.E. y Douglas, C.J. (1998) 4-Coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiol* **116**: 743-754.
- Allwood, E.G., Davies, D.R., Gerrish, C., Ellis, B.E. y Bolwell, G.P. (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett* **457**: 47-52.
- Aramayo, R. y Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA*. *Embo J* **12**: 2039-2048.

- Axelrod, D.E. (1972) Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **73**: 181-184.
- Axelrod, D.E., Gealt, M. y Pastushok, M. (1973) Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**: 9-15.
- Becker-Andre, M., Schulze-Lefert, P. y Hahlbrock, K. (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of the two 4-coumarate: CoA ligase genes in potato. *J Biol Chem* **266**: 8551-8559.
- Berman, D.M., Kozasa, T. y Gilman, A.G. (1996) The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J Biol Chem* **271**: 27209-27212.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willet, C.E., Zimmerman, R. y Timberlake, W.E. (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**: 3113-3118.
- Breathnach, R. y Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**: 349-383.
- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J. y Timberlake, W.E. (1991) Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **19**: 3105-3109.
- Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H. y Leonard, T.J. (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1418-1422.
- Burglin, T.R. (1991) The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**: 11-12.
- Busby, T.M., Miller, K.Y. y Miller, B.L. (1996) Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics* **143**: 155-163.
- Busch, S., Eckert, S.E., Krappmann, S. y Braus, G.H. (2003) The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **49**: 717-730.
- Buss, J.E., Mumby, S.M., Casey, P.J., Gilman, A.G. y Sefton, B.M. (1987) Myristoylated alpha subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7493-7497.

- Butchko, R.A., Adams, T.H. y Keller, N.P. (1999) *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics* **153**: 715-720.
- Butnick, N.Z., Yager, L.N., Hermann, T.E., Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1984) Mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation secrete an unusual metabolite. *J Bacteriol* **160**: 533-540.
- Caddick, M.X., Arst, H.N., Jr., Taylor, L.H., Johnson, R.I. y Brownlee, A.G. (1986) Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **5**: 1087-1090.
- Calvo, A.M., Gardner, H.W. y Keller, N.P. (2001) Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **276**: 25766-25774.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. y Keller, N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447-459, table of contents.
- Capon, R.J., Ratnayake, R., Stewart, M., Lacey, E., Tennant, S. y Gill, J.H. (2005) Aspergillazines A-E: novel heterocyclic dipeptides from an Australian strain of *Aspergillus unilateralis*. *Org Biomol Chem* **3**: 123-129.
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C., Wright, M., Chang, P.K. y Bhatnagar, D. (2000) Generation of aflR disruption mutants of *Aspergillus parasiticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 680-684.
- Champe, S.P., Rao, P. y Chang, A. (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **133**: 1383-1387.
- Champe, S.P. y el-Zayat, A.A. (1989) Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **171**: 3982-3988.
- Champe, S.P. y Simon, D.L. (1992) Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *En Rossomando, E.F. y Alexander, S. (ed) Morphogenesis: an analysis of the development of biological form. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.*: 63-91.
- Choi, G.H., Chen, B. y Nuss, D.L. (1995) Virus-mediated or transgenic suppression of a G-protein alpha subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 305-309.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.

- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G. y Sprang, S.R. (1994) Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**: 1405-1412.
- Conti, E., Franks, N.P. y Brick, P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. y Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **16**: 4174-4183.
- Cornwell, E.V. y MacDonald, D.W. (1984) *glnA* mutations define the structural gene for glutamine synthetase in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **8**: 33-36.
- Cukovic, D., Ehltng, J., VanZiffle, J.A. y Douglas, C.J. (2001) Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. *Biol Chem* **382**: 645-654.
- D'Souza, C.A., Lee, B.N. y Adams, T.H. (2001) Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **158**: 1027-1036.
- Dietzel, C. y Kurjan, J. (1987) The yeast SCG1 gene: a G alpha-like protein implicated in the a- and alpha-factor response pathway. *Cell* **50**: 1001-1010.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688.
- Dohlman, H.G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J. y Nusskern, D. (1995) Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 3635-3643.
- Dohlman, H.G., Song, J., Ma, D., Courchesne, W.E. y Thorner, J. (1996) Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol* **16**: 5194-5209.

- Dorn, G.L. (1970) Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **66**: 267-279.
- Douglas, C.J. (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis, from weeds to trees. *Trends Plant Sci* **1**: 171-178.
- Dutton, J.R., Johns, S. y Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **16**: 5710-5721.
- Dym, O. y Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**: 1712-1728.
- Ehltling, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. y Kombrink, E. (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J* **19**: 9-20.
- Ehltling, J., Shin, J.J. y Douglas, C.J. (2001) Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* **27**: 455-465.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G. y Cary, J.W. (1999) Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene* **230**: 249-257.
- Friend, J. (1985) Phenolic substances and plant disease. *En The biochemistry of plant phenolics ed C.F. van Sumere, P.J. Lea. Oxford: Clarendon*: 367-392.
- Fulda, M., Heinz, E. y Wolter, F.P. (1994) The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol Gen Genet* **242**: 241-249.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, 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., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A. y Birren, B.W. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.

- Gensheimer, M. y Mushegian, A. (2004) Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants. *Protein Sci* **13**: 540-544.
- Gimeno, C.J. y Fink, G.R. (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**: 2100-2112.
- Gooday, G.W. (1983) In Secondary metabolism and differentiation in fungi (ed Bennett J.W. y Ciegler Marcel) Dekker, New York: 239-266.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. y Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**: 1657-1664.
- Gross, G.G., Bolkart, K.J. y Zenk, M.H. (1968) Reduction of cinnamic acid to cinnamaldehyde an alcohol. *Biochem Biophys Res Commun* **32**: 173-178.
- Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Sibley, S., Davies, R.W., Lockington, R.A., Scazzocchio, C. y Sealy-Lewis, H.M. (1987) Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **51**: 205-216.
- Hahlbrock, K. y Grisebach, H. (1979) Enzymatic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu Rev Plant Physiol Plant* **30**: 105-130.
- Hahlbrock, K. y Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369.
- Hamberger, B. y Hahlbrock, K. (2004) The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2209-2214.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R.A. y Adams, T.H. (1993) Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *Embo J* **12**: 2449-2457.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* **142**: 201-221.
- Hettema, E.H., Distel, B. y Tabak, H.F. (1999) Import of proteins into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1451**: 17-34.

- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P. y Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *Embo J* **16**: 4916-4923.
- Hill, T.W. y Kafer, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newslett* **48**: 20-21.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. y Bairoch, A. (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 215-219.
- Hwan kim, S., Kronstad, W.J. y Ellis, E.B. (2001) Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* **58**: 849-857.
- Juvvadi, P.R., Seshime, Y. y Kitamoto, K. (2005) Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *J Microbiol* **43**: 475-486.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K. y Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153-1163.
- Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 937-947.
- Kellner, E.M. y Adams, T.H. (2002) Mutations in *sfdA* and *sfdB* suppress multiple developmental mutations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **160**: 159-168.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990) C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**: 19-26.
- Kumada, Y., Benson, D.R., Hillemann, D., Hosted, T.J., Rochefort, D.A., Thompson, C.J., Wohlleben, W. y Tateno, Y. (1993) Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3009-3013.
- Kurjan, J. (1992) Pheromone response in yeast. *Annu Rev Biochem* **61**: 1097-1129.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. y Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**: 621-628.

- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. y Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**: 1241-1255.
- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1994a) *The Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**: 641-651.
- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1994b) Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**: 323-334.
- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1995) FluG and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *Embo J* **15**: 299-309.
- Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C. y Davies, R.W. (1985) Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **33**: 137-149.
- Maplestone, R.A., Stone, M.J. y Williams, D.H. (1992) The evolutionary role of secondary metabolites--a review. *Gene* **115**: 151-157.
- Marhoul, J. y Adams, T.H. (1997) Isolation of *Aspergillus nidulans* Mutants That Overcome *brlA*-Induced Growth Arrest. *Fungal Genet Biol* **21**: 109-117.
- Marshall, M.A. y Timberlake, W.E. (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**: 55-62.
- Martinelli, S.D. y Clutterbuck, A.J. (1971) A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **69**: 261-268.
- Martinelli, S.D. (1976) Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Trans Br Mycol Soc* **67**: 121-128.
- Martinelli, S.D. (1994) *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Prog Ind Microbiol* **29**: 33-58.
- Marusich, W.C., Jensen, R.A. y Zamir, L.O. (1981) Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase during utilization of phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*. *J Bacteriol* **146**: 1013-1019.
- Mathis, R., Grosjean, C., de Billy, F., Huguet, T. y Gamas, P. (1999) The early nodulin gene MtN6 is a novel marker for events preceding infection of *Medicago truncatula* roots by *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 544-555.

- Mazur, P., Meyers, H.V., Nakanishi, K., A.E., E.-Z. y Champe, S.P. (1990) Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites in *Aspergillus nidulans*. *Tetrahedron Letter* **31**: 3837.
- Miller, B. (1993) The *medA* gene of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biochem* **17C**.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Harbor Laboratory.
- Miller, K.Y., Toennis, T.M., Adams, T.H. y Miller, B.L. (1991) Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol Gen Genet* **227**: 285-292.
- Miller, K.Y., Wu, J. y Miller, B.L. (1992) StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* **6**: 1770-1782.
- Mims, C.W., Richardson, E.A. y Timberlake, W.E. (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **44**: 132-141.
- Mirabito, P.M., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859-868.
- Mooney, J.L., Hassett, D.E. y Yager, L.N. (1990) Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**: 869-874.
- Mooney, J.L. y Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473-1482.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A. y Oakley, B.R. (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257.
- Neustaedter, D.A., Lee, S.P. y Douglas, C.J. (1999) A novel parsley 4CL1 cis-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. *Plant J* **18**: 77-88.
- Orr, W.C. y Timberlake, W.E. (1982) Clustering of spore-specific genes in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 5976-5980.

- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A. y Saedler, H. (1987) The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J* **6**: 3553-3558.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D. y Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.
- Prade, R.A. y Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *Embo J* **12**: 2439-2447.
- Rens-Domiano, S. y Hamm, H.E. (1995) Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *Faseb J* **9**: 1059-1066.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. y Ficner, R. (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J* **18**: 6823-6831.
- Rosen, S., Yu, J.H. y Adams, T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *Embo J* **18**: 5592-5600.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, O., Navarro, R.E. y Aguirre, J. (1998) Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **258**: 89-94.
- Sanchez, O., Aguirre, J. (1996) Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newslett* **43**: 48-41.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. y Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434.
- Schiestl, R.H. y Petes, T.D. (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7585-7589.
- Schneider, K., Hovel, K., Witzel, K., Hamberger, B., Schomburg, D., Kombrink, E. y Stuible, H.P. (2003) The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8601-8606.

- Schneider, K., Kienow, L., Schmelzer, E., Colby, T., Bartsch, M., Miersch, O., Wasternack, C., Kombrink, E. y Stuible, H.P. (2005) A new type of peroxisomal acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. *J Biol Chem* **280**: 13962-13972.
- Schroder, J. (1989) Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Res* **17**: 460.
- Seo, J.A., K.H., H. y Yu, J.H. (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 81-89.
- Seo, J.A., Guan, Y. y Yu, J.H. (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544.
- Seshime, Y., Juvvadi, P.R., Fujii, I. y Kitamoto, K. (2005) Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 253-260.
- Sheppard, D.C., Doedt, T., Chiang, L.Y., Kim, H.S., Chen, D., Nierman, W.C. y Filler, S.G. (2005) The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. *Mol Biol Cell* **16**: 5866-5879.
- Shimizu, K. y Keller, N.P. (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**: 591-600.
- Shockey, J.M., Fulda, M.S. y Browse, J. (2003) *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. *Plant Physiol* **132**: 1065-1076.
- Sikora, L.A. y Marzluf, G.A. (1982) Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **150**: 1287-1291.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-808.
- Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans briA* regulatory gene. *Microbiology* **141 (Pt 1)**: 21-28.

- Soid-Raggi, G., Sanchez, O. y Aguirre, J. (2006) TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **59**: 854-869.
- Stachelhaus, T., Huser, A. y Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **3**: 913-921.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. y Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **273**: 22773-22781.
- Stinett, S.M., Cobeno, L., Espeso, E., Calvo, A. (2006) VeA subcellular localization is dependent on light in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *8th European Conference on fungal genetics*.
- Stuible, H., Buttner, D., Ehltng, J., Hahlbrock, K. y Kombrink, E. (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett* **467**: 117-122.
- Stuible, H.P. y Kombrink, E. (2001) Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate:coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties. *J Biol Chem* **276**: 26893-26897.
- Subramani, S., Koller A. y Snyder, W.B. (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **69**: 399-418.
- Sweeney, M.J. y Dobson, A.D. (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **175**: 149-163.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C., Jr., Phillips, T.D., Beremand, M. y Keller, N. (2000) G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol* **38**: 658-665.
- Tamame, M., Antequera, F., Villanueva, J.R. y Santos, T. (1983) High-frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene. *Mol Cell Biol* **3**: 2287-2297.
- Tapia, R.L. (1996) Caracterización genética y fisiología de una mutante afectada en el inicio de la esporulación asexual en *Aspergillus nidulans*. *Tesis de Maestría. UNAM. Mexico 89 pp.*

- Tice-Baldwin, K., Fink, G.R. y Arndt, K.T. (1989) BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science* **246**: 931-935.
- Timberlake, W.E. (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **78**: 497-510.
- Timberlake, W.E. y Marshall, M.A. (1988) Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet* **4**: 162-169.
- Timberlake, W.E. (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development **24**: 5-36.
- Toh, H. (1990) N-terminal halves of gramicidin S synthetase 1, and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. *Protein Seq Data Anal* **3**: 517-521.
- Tsitsigiannis, D., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. y Keller, N.P. (2004) Lipogenic signals act as developmental regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1398-1411.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. y Keller, N.P. (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**: 1809-1821.
- Turgay, K., Krause, M. y Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**: 2743-2744.
- Turner, G.E. y Borkovich, K.A. (1993) Identification of a G protein alpha subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the Gi family. *J Biol Chem* **268**: 14805-14811.
- Varbanova, M.P., Atanassov, A.I. y Atanassov, I.I. (2003) Anther-specific coumatate CoA ligase-like gene from *Nicotiana sylvestris* expressed during uninucleate microspore development. *Plant Science* **164**: 525-530.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Ward, M. (1991) *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. *Modern Microbial Genetics*: 455-493.

- West, R.E., Jr., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T. y Liu, T.Y. (1985) *Pertussis* toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J Biol Chem* **260**: 14428-14430.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J., 3rd y Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62-69.
- Wieser, J. y Adams, T.H. (1995) flbD encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**: 491-502.
- Wieser, J., Yu, J.H. y Adams, T.H. (1997) Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **32**: 218-224.
- Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M. y Losick, R. (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* **65**: 641-650.
- Yager, L.N., Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1982) Temperature-shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **93**: 92-103.
- Yager, L.N., Lee, H.O., Nagle, D.L. y Zimmerman, J.E. (1998) Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**: 1777-1786.
- Yelton, M.M., Hamer, J.E. y Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1470-1474.
- Yu, J.H., Wieser, J. y Adams, T.H. (1996) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *Embo J* **15**: 5184-5190.
- Yu, J.H., Rosen, S. y Adams, T.H. (1999) Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the *Aspergillus* FlbA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics* **151**: 97-105.
- Zhang, X.H. y Chiang, V.L. (1997) Molecular cloning of 4-coumarate:coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol* **113**: 65-74.

Zimmermann, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F., Barnard, E.C. y Timberlake, W.E. (1980) Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* **21**: 709-715.

Zonneveld, B.J. (1975) Sexual differentiation in *Aspergillus nidulans*: the requirement for manganese and its effect on alpha-1,3 glucan synthesis and degradation. *Arch Microbiol* **105**: 105-108.