



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

***fluF* ES UN ALELO DEL GEN *flbD*, EL CUAL REGULA LA
DIFERENCIACIÓN ASEJUAL Y SEXUAL EN EL HONGO
*Aspergillus nidulans***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

QFB. JENNY ARRATIA QUIJADA

TUTOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

COMITÉ TUTOR:

DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO

FACULTAD DE QUÍMICA

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

México, D.F.

noviembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Se reconoce el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González durante la realización de este trabajo.

Se reconoce a Fabián Márquez González por su asistencia en el laboratorio.

Se reconoce la colaboración de la Unidad de Biología Molecular y la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular.

Durante los estudios de Doctorado Jenny Arratia Quijada contó con el apoyo económico de la DGEP-UNAM y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Número de becario 166609) para la realización del presente trabajo. Además se realizó una estancia de investigación en la Facultad de Ciencias de Orsay en Paris, Francia, la cual estuvo financiada por un donativo del Dr. Claudio Schazzocchio.

Este trabajo se financió con recursos de los donativos **CB-2005-01-49667** y **153256** otorgados por CONACyT, y **IN209211-2**, otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM), así como por el donativo en colaboración DFG-CONACyT Alemania-México **75306**.

A mi querido esposo David Tamayo

A mis pequeños Emiliano y Sebastián

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1. Los factores de transcripción tipo Myb y su papel en la diferenciación celular	5
1.1. Posible regulación redox de las proteínas Myb	9
1.2. Las proteínas Myb como reguladores de la diferenciación celular en los hongos	12
2. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental	16
2.1. El desarrollo asexual en <i>A. nidulans</i>	17
2.1.1. El inicio de la conidiación: una respuesta al ambiente extracelular	18
2.1.2. El programa de desarrollo: la construcción del conidióforo	21
2.1.3. La decisión final: la conidiogénesis	23
2.2. El desarrollo sexual en <i>A. nidulans</i>	24
2.2.1. Las señales ambientales y endógenas que regulan la diferenciación sexual: la luz, los nutrientes, el estrés y las hormonas	25
2.2.2. El proceso de apareamiento	30
2.2.3. Las vías de transducción de señales	31
2.2.4. La regulación del desarrollo sexual	33
2.2.5. La producción y la maduración de las ascosporas	35
2.2.6. Los componentes estructurales de los cuerpos fructíferos o cleistotecios	36
II. JUSTIFICACIÓN	38
III. OBJETIVOS	39
3. OBJETIVO GENERAL	39
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES	39
IV. RESULTADOS	40
4.1. Asignación de la mutación <i>fluF1</i> a un cromosoma y mapeo genético	40
4.2. <i>fluF1</i> es un nuevo alelo del gen <i>flbD</i>	42
4.3. Diferentes alelos de <i>flbD</i> muestran un desarrollo asexual distintivo	44
4.4. El papel de la cisteína C46 del dominio Myb de FlbD en el desarrollo asexual	49

4.5. FlbD regula la diferenciación sexual	52
4.6. El gen <i>flbD</i> es el único gen <i>fluffy</i> que regula el desarrollo sexual	56
4.7. El papel de <i>flbD</i> durante el desarrollo sexual es independiente del gen <i>veA</i>	57
4.8. La importancia del residuo de cisteína C46 del dominio Myb de FlbD en el desarrollo sexual	58
4.9. FlbD regula la conidiación en respuesta a la privación de nitrógeno	62
4.10. Clonación del gen <i>gal83A</i> como un supresor en multicopia del fenotipo <i>fluF1</i>	63
4.11. Eliminación del gen <i>gal83A</i> y caracterización de las mutantes	69
V. DISCUSIÓN	75
5.1. FlbD se requiere para la formación del peridio de los cuerpos fructíferos	75
5.2. FlbD ^{C46A} una sustitución funcional en la conidiación y en el desarrollo sexual	76
5.3. FlbD ^{C46A} no muestra reproducción asexual en respuesta a la privación de nitrógeno	77
5.4. Las EROs se requieren para la producción del peridio y de las ascosporas durante el desarrollo sexual	78
5.5. La sobre-expresión de Gal83A suprime parcialmente el defecto de conidiación de la mutante <i>flbD</i> ^{R47P} (<i>fluF1</i>)	78
5.6. Gal83A está involucrada en la respuesta al estrés osmótico y al estrés nutricional inducido por nitrógeno	81
VI. CONCLUSIONES	83
VII. PERSPECTIVAS	84
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	87
8.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	87
8.1.1. <i>Aspergillus nidulans</i>	87
8.1.2. <i>Escherichia coli</i>	88
8.2. Análisis genético	88
8.2.1. Análisis meiótico	88
8.2.2. Mapeo genético	89
8.3. Determinación del número de esporas/cm ² .	90
8.4. Inducción del ciclo sexual	91

8.5. Determinación del número de cleistotecios/cm ²	91
8.6. Cultivos de limitación de nitrógeno.	92
8.7. Técnicas de biología molecular	92
8.7.1. Eliminación de genes	92
8.7.2. Extracción de DNA y RNA	92
8.7.3. Determinación del mRNA de los genes <i>flbD</i> , <i>brlA</i> , <i>gal83A</i> y <i>alcA</i>	93
8.7.4. Hibridación tipo <i>Southern</i> y <i>Northern blot</i>	94
8.7.5. Construcción de alelos mutantes en el gen <i>flbD</i>	95
8.7.6. Cepas empleadas en este trabajo	96
8.7.7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	99
IX. REFERENCIAS	104
APÉNDICE	115
I. Figuras suplementarias	115
II. Artículos publicados	136

RESUMEN

Los organismos multicelulares desarrollan una gran variedad de tipos celulares a lo largo de su ciclo de vida. La diferenciación de estos distintos tipos celulares requiere de la cooperación coordinada de reguladores transcripcionales clave, los cuales responden a señales externas e internas. En el hongo *Aspergillus nidulans*, la diferenciación asexual o conidiación se induce por señales ambientales como la exposición al aire o la limitación de nutrientes, y depende del factor transcripcional BrlA. Los reguladores del desarrollo codificados por los genes *flbA* a *flbE*, *fluG*, *fluF* y *tmpA* se requieren para la expresión adecuada del gen *brlA* y su eliminación produce un fenotipo algodonoso o *fluffy* característico. Sin embargo, se desconoce aún la función exacta de estos reguladores. En este trabajo, identificamos al gen *fluF1* como un alelo del gen *flbD*, el cual produce la sustitución R47P en la proteína FlbD. La comparación de las mutantes $\Delta flbD$ y $flbD^{R47P}$ permitió identificar un papel nuevo y específico para *flbD* durante el desarrollo sexual. Mientras que la mutante $flbD^{R47P}$ muestra una función parcial durante la conidiación, las mutantes $\Delta flbD$ y $flbD^{R47P}$ son incapaces de desarrollar el peridio, un tejido externo especializado que se desarrolla durante la formación de los cuerpos fructíferos (cleistotecios) y termina rodeando las ascas y esporas sexuales. Esta función única entre los genes cuya mutación produce un fenotipo algodonoso no afecta la viabilidad de las esporas desnudas que producen estas mutantes. Sin embargo, aún en un fondo $\Delta flbD$, el desarrollo de las ascosporas depende de la NADPH oxidasa NoxA. Los aminoácidos C46 y R47 presentes en el dominio Myb de FlbD se encuentran muy conservados en toda la familia de proteínas Myb y se ha propuesto que C46 podría mediar una posible regulación redox. Por ello se generaron los alelos mutantes R47K, C46D, C46S y C46A y evaluamos sus efectos en el desarrollo asexual y sexual. Los defectos en la conidiación más severos se observaron en mutantes $\Delta flbD$, en tanto que, en las cepas mutantes R47P, C46D y C46S fueron mas notables que en la mutante R47K. En cambio, la mutante $flbD^{C46A}$ tiene un fenotipo silvestre en la diferenciación sexual y, únicamente, mostró defectos en la conidiación inducida por privación de nitrógeno en cultivos líquidos. Las mutantes R47K,

R47P, C46D y C46S fueron incapaces de formar el tejido peridial, mientras que la mutante *flbD*^{C46A} tuvo un desarrollo normal del peridio y un incremento en la producción de cleistotecios. Nuestros resultados muestran que FlbD regula tanto la diferenciación asexual como la sexual, sugiriendo que ambos procesos requieren de la actividad de unión al DNA de FlbD, y que esta proteína también está involucrada en la respuesta a la limitación de nitrógeno. Nuestros resultados también demuestran que la formación del peridio y de las ascosporas son dos procesos de diferenciación celular separables entre sí e independientes.

Adicionalmente, identificamos al gen *gal83A* como un supresor parcial del fenotipo algodonoso de la mutante *fluF1 (flbD*^{R47P}) mediante su transformación con una biblioteca genómica para tratar de complementar la mutación. La proteína Gal83A es homóloga de la subunidad β del complejo SNF1 de *S. cerevisiae*, el cual está involucrado en la esporulación y en la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa. En *A. nidulans* la mutante $\Delta gal83A$ mostró una disminución en su crecimiento en fuentes de carbono tales como la galactosa, el glicerol y la pectina, en una vía independiente de CreA, el regulador maestro de la utilización de carbono. Datos previos indican que Snf1 no es un componente clave de la represión catabólica del carbono en *A. nidulans*. Nuestro trabajo sugiere que Gal83A juega un papel en la conidiación, en la respuesta a la limitación de nitrógeno y al estrés osmótico.

ABSTRACT

Multicellular organisms differentiate a variety of cell types during their life cycles in a process that requires the coordinated interplay of key transcriptional regulators, which in turn are regulated by internal and external cues. Asexual differentiation in *Aspergillus nidulans* is induced by environmental signals like exposure to air or nutrient starvation and depends on *brlA* gene activation. Developmental regulators acting upstream of *brlA* (*flbA* to *flbE*, *fluG*, *fluF* and *tmpA* genes) are required for its proper expression and mutants in these genes show delayed asexual development (*fluffy* phenotype) and reduced expression of *brlA*. However, the exact function of these regulators remains unknown. Here we show that *fluF1* is an allele of *flbD*, which results in a R47P substitution. Amino acids C46 and R47 are highly conserved in FlbD and many other Myb proteins, and C46 has been proposed to mediate redox regulation. Comparison of $\Delta flbD$ and $flbD^{R47P}$ mutants uncovered a new and specific role for *flbD* during sexual development. While $flbD^{R47P}$ mutants retain partial function during conidiation, both $\Delta flbD$ and $flbD^{R47P}$ mutants are unable to develop the peridium, a specialized external tissue that differentiates during fruiting body formation and which ends up surrounding the sexual spores. This function, unique among other *fluffy* genes, does not affect the viability of the naked ascospores produced by mutant strains. Notably, ascospore development in these mutants is still dependent on NADPH oxidase NoxA. We generated mutant alleles R47K, C46D, C46S and C46A and evaluated the effects on asexual and sexual development. R47K substitution affects conidiation less strongly than R47P, while C46D and C46S substitutions resulted in defective conidiation, similarly to $flbD^{R47P}$. All these mutants failed to develop any peridial tissue. In contrast, mutants carrying the $flbD^{C46A}$ allele showed wild type conidiation in solid culture but failed to develop conidiophores in liquid culture under nitrogen starvation. The $flbD^{C46A}$ strain showed normal peridium development and increased cleistothecia formation. Our results show that FlbD regulates both asexual and sexual differentiation, suggesting that both processes require FlbD DNA-binding activity, and that FlbD is involved in the response to nitrogen starvation. They also show that peridium and

ascospore development, previously considered as a single developmental process, can be separated in time and space.

In addition we have identified the *gal83A* gene as a partial suppressor of *fluF1* (*flbD^{R47P}*) *fluffy* mutant phenotype through transformation with a genomic library for complement the mutation. Gal83A is homolog of β subunit of SNF1 complex from *S. cerevisiae*, which is involved in sporulation and utilization of alternative carbon sources. In *A. nidulans* a $\Delta gal83A$ mutant showed a reduction of cell growth on carbon sources such as galactose, glycerol and pectine in an independent pathway of carbon regulator CreA but according to previous data, Snf1 is not a key component of carbon catabolite repression in *A. nidulans*. Our work suggests that Gal83A plays a role in conidiation, nitrogen starvation and osmotic stress responses.

I. INTRODUCCIÓN

1. Los factores de transcripción tipo Myb y su papel en la diferenciación celular.

La regulación diferencial de la expresión genética a nivel de la transcripción es un mecanismo de control ubicuo en muchos procesos biológicos, tales como el metabolismo y la diferenciación celular. Durante el proceso de la transcripción se requiere de la participación de diversas proteínas, entre las cuales se encuentran los complejos remodeladores de la cromatina, los factores del complejo de pre-iniciación y el complejo de la RNA polimerasa II. En particular, se requiere de proteínas que regulan la fuerza del promotor, los cuales se denominan factores de transcripción (FT). Estos factores se unen al DNA (ácido desoxirribonucleico), reconociendo una secuencia específica. Una vez unidos a la región promotora de su gen blanco, aunque también pueden unirse a otros factores o incluso a la RNA polimerasa directamente, regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Los FT pueden actuar como activadores, represores o ambos (si tienen una estructura modular) de la transcripción de su(s) gen(es) blanco. En base a la estructura del dominio de unión al DNA, los factores de transcripción se han clasificado en grupos, tales como las familias con dominios de dedos de zinc, hélice-giro-hélice, cremallera de leucina, hélice-bucle-hélice, entre otros.

Dentro de la familia de FT hélice-giro-hélice se encuentran los factores de transcripción tipo Myb, nombrados así porque el primer gen de este tipo que se identificó fue el oncogen *v-myb* del virus del mieloblastoma aviar (Klempnauer et al. 1982). Desde entonces, se han identificado diversas proteínas con dominios Myb en los protozoarios (Meneses et al. 2010; Stober-Grasser et al. 1992), los hongos (Pinson et al. 1998; Wieser and Adams 1995), las algas (Rubio et al. 2001), las plantas (Du et al. 2009) y los animales (Oh and Reddy 1999).

En general, los FT Myb se han implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular, la regulación del metabolismo y la señalización celular en respuesta a estímulos externos (Dubos et al. 2010).

Una característica común de las proteínas Myb es la presencia de un dominio de unión al DNA que típicamente se encuentra cerca de la región N-terminal y que está conservado entre los animales, las plantas, los protozoarios y los hongos. Un dominio Myb mínimo consiste en dos regiones de cerca de 50 aminoácidos de longitud, las cuales son capaces de formar tres hélices alfa (H1-H3) cada una (Figura 2A), y así unirse al DNA (Sakura et al. 1989). Cada una de estas secuencias repetidas imperfectas contiene tres residuos de triptófano (o aminoácidos hidrofóbicos) espaciados regularmente (Saikumar et al. 1990), los cuales constituyen un centro hidrofóbico en el plegamiento tridimensional hélice-giro-hélice de cada región repetida (Ogata et al. 1996), el cual confiere estabilidad a la unión al DNA. Gran parte de las proteínas Myb presentan tres de estas secuencias repetidas imperfectas (designadas como R1, R2 y R3) (Sakura et al. 1989), aunque también se han identificado proteínas con cuatro o más segmentos repetidos (Dubos et al. 2010) (Figura 1). Las secuencias repetidas de la proteína Myb prototipo, la proteína c-Myb, son referidas como R1, R2, y R3. Los segmentos repetidos de otras proteínas Myb se nombran de acuerdo a su similitud con R1, R2 o R3 de c-Myb.

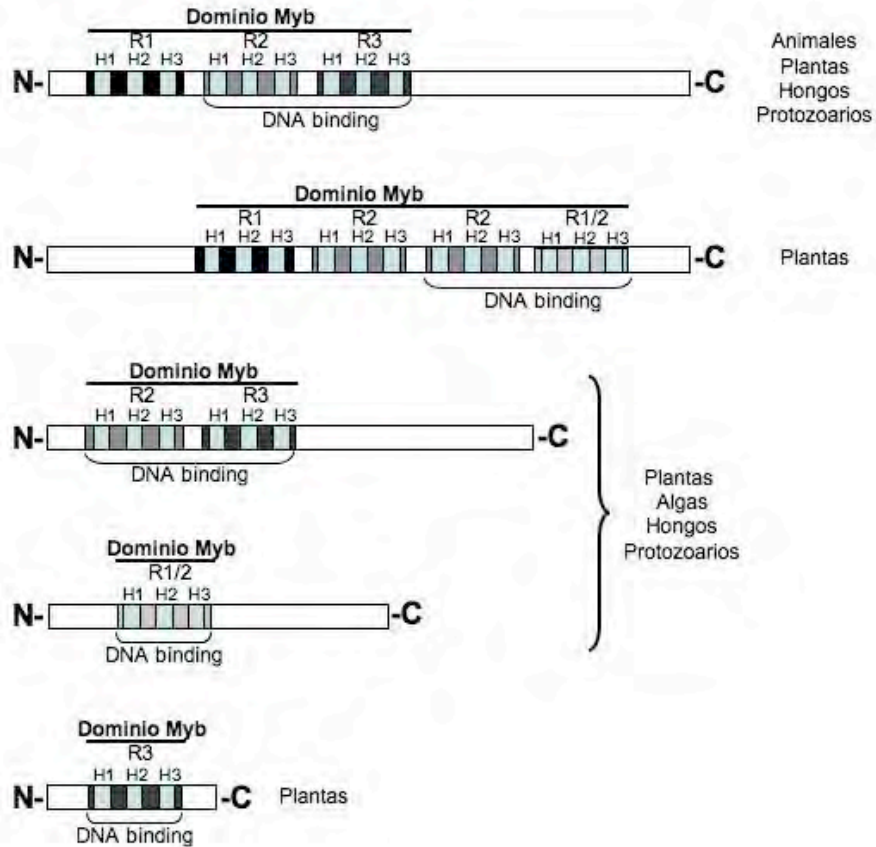


Figura 1. Clases de proteínas Myb. El esquema muestra las diferentes clases de proteínas Myb presentes en los organismos eucariotes dependiendo del número de secuencias repetidas, señaladas por R1, R2, R3. Se indica la estructura secundaria (hélice) mediante las barras H1, H2, H3 y el dominio de unión al DNA por medio de corchetes.

Sólo las secuencias R2 y R3 se requieren para la unión al DNA en forma específica (dominio mínimo de unión al DNA) (Sakura et al. 1989), mientras que R1 se piensa que estabiliza el complejo DNA-proteína a través de interacciones electrostáticas (Ogata et al. 1995; Ording et al. 1994). El elemento de reconocimiento de Myb en el DNA (MRE por sus siglas en inglés) se definió como la secuencia consenso PyAACG/TG (Biedenkapp et al. 1988; Weston 1992). Esta secuencia se reconoce a través del motivo doble HTH (hélice-giro-hélice), usando la tercer hélice alfa de reconocimiento (más conservada), de los segmentos repetidos R2 y R3, las cuales unidas al DNA están empaçadas en el surco mayor (Ogata et al. 1994). Los residuos clave que hacen contacto directo con las bases del DNA incluyen K128 (R2), N183 (R3) y K182 (R3) (Figura 2B). De este modo, R3 reconoce

principalmente a la primera mitad del sitio, YAAC, y R2 a la segunda mitad del sitio, NGHH (Ogata et al. 1994), lo que da la apariencia de dímeros ligados en forma covalente (Ogata et al. 1995). Las proteínas Myb que sólo poseen R2R3 se cree que se unen al DNA en un modo similar.

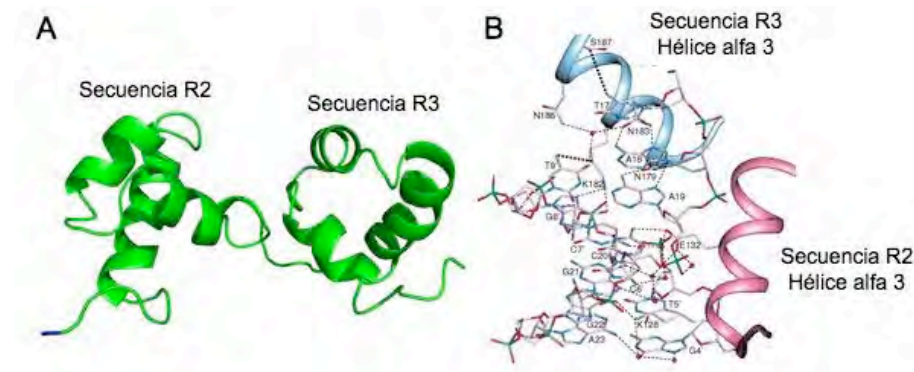


Figura 2. Dominio Myb mínimo e interacción específica con las bases del DNA. (A) Representación de Ribbon del dominio mínimo de unión al DNA R2R3 de la proteína c-Myb (color verde) (código PDB 1MSF P06876), que muestra el arreglo estructural hélice-giro-hélice. (B) La tercer hélice alfa de reconocimiento de los segmentos repetidos R2 y R3 hace contacto directo con las bases del DNA a través de los residuos K128 (R2), N183 (R3) y K182 (R3). La tercer hélice alfa de los segmentos repetidos R2 y R3 del dominio Myb de la proteína c-Myb se representan en rosa y azul, respectivamente. El modelo se genero en el programa PyMOL. Modificada de Tahirov (Tahirov et al. 2002).

Las proteínas Myb con sólo una secuencia repetida no se pueden unir al DNA como tal, sino que deben formar heterodímeros y homodímeros, lo que permite a estas proteínas reconocer el DNA con alta afinidad y especificidad (Dubos et al. 2010).

La estructura que muestran los segmentos repetidos de las proteínas Myb se parece a la de los dominios SANT, los cuales se han identificado previamente en proteínas reguladoras de la cromatina, como Swi3 de levadura, Ada2 de levadura, NcoR de humano, TFIIB e ISWI de levadura (Aasland et al. 1996) . Los dominios SANT son incapaces de unirse al DNA pero reconocen las colas de las histonas e interaccionan con enzimas modificadoras de histonas, tales como acetilasas y desacetilasas y complejos

remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Boyer et al. 2002), con lo cual facilitan el reconocimiento del sustrato y aumentan la actividad de dichas enzimas modificadoras de histonas (Mo et al. 2005).

1.1. Posible regulación redox de las proteínas Myb.

Los dominios de unión al DNA en un factor de transcripción tienen como función principal el reconocer a una secuencia específica del DNA, pero pueden además llevar a cabo interacciones proteína-proteína. La cisteína es uno de los residuos de aminoácido más conservados durante la evolución de las proteínas y ha sido implicado en la unión al DNA, las interacciones proteína-proteína y la regulación redox de varias proteínas (Grasser et al. 1992). Las proteínas Myb se regulan por redox *in vitro* y es probable que esto también ocurra *in vivo*. En la secuencia repetida R2 contienen un residuo de cisteína invariante que corresponde a C130 en c-Myb de humano, cuya reducción es esencial para la unión de c-Myb al DNA *in vitro*. Este residuo es sensible a condiciones oxidantes, de tal modo que cuando se encuentra reducido impide la unión específica al DNA ya que controla el cambio conformacional en R2 inducido por la unión al DNA (Myrset et al. 1993).

Las proteínas A-, B- y c-Myb de vertebrados tienen una cisteína adicional en R1, localizada en una posición que corresponde a C130 en R2. A-Myb contiene sólo esas dos cisteínas, pero c-Myb contiene una tercer cisteína en la región N-terminal, mientras que B-Myb contiene cuatro cisteínas distribuidas a través del DBD (DNA binding domain por sus siglas en inglés). La sensibilidad redox de A-Myb *in vitro* es comparable a la de c-Myb. Mientras que B-Myb es mucho más sensible a las condiciones oxidantes comparado con las otras dos proteínas (Bergholtz et al. 2001); lo cual podría explicarse por la presencia de los cuatro residuos de cisteína en el dominio de unión al DNA. Estos estudios acerca de la sensibilidad redox se realizaron incluyendo la región del dominio Myb R1R2R3; sin embargo, los resultados de un análisis *in vitro* sólo con la región R2R3 de c-Myb mostró

mayor sensibilidad a condiciones oxidantes (Brendeford et al. 1997). Esto sugiere la hipótesis de que la cisteína de la segunda secuencia repetida en A- y c-Myb juega un papel mayor en la regulación redox de unión al DNA (Bergholtz et al. 2001). La hipótesis coincide con el análisis minucioso *in vitro* de la modificación de la cisteína C153 en Bas1p de *S. cerevisiae*, indicando que la sensibilidad redox de la cisteína en el segundo segmento repetido R2 es una característica altamente conservada de la familia Myb (Pinson et al. 2001). Dado que ni la región amino terminal ni la secuencia repetida R1 participan directamente en el reconocimiento del DNA, la oxidación de las cisteínas en esas regiones no parece tener efecto alguno sobre la interacción con el DNA. Por su parte, la proteína v-Myb con la sustitución C65S (equivalente a la C130 de otras proteínas Myb) es incapaz de activar la transcripción *in vivo* y de transformar células mieloides, a pesar de ser transportada al núcleo (Grasser et al. 1992).

Por otro lado, se ha visto que agentes que generan NO (óxido nítrico) inhiben la actividad de unión al DNA de c-Myb *in vitro* y esta sensibilidad depende de la C130 conservada en el segmento repetido R2 (Brendeford et al. 1998). En las plantas también se ha reportado la regulación de la proteína Myb AtMyb2 *in vitro* (proteína Myb R2R3 típica de *Arabidopsis thaliana*) por S-nitrosilación que involucra al residuo de cisteína C53 (equivalente a C130 de c-Myb) (Serpa et al. 2007).

A diferencia de las proteínas Myb R1R2R3 de animales que solo tienen una cisteína a través de la cual parecen regularse por redox, muchas proteínas Myb R2R3 de plantas contienen dos cisteínas, C49 y C53, siendo la C53 equivalente a la C130 en las proteínas Myb R1R2R3. La C49 se encuentra conservada en dominios Myb R2R3 típicos, pero no está presente en los dominios Myb atípicos o en los dominios Myb de proteínas Myb R1R2R3 (Heine et al. 2004).

Un ejemplo de proteínas Myb con dos cisteínas es P1, el regulador de la biosíntesis de los flavonoides en maíz, una proteína típica Myb R2R3. Un análisis *in vitro* indicó que la

actividad de unión al DNA de la mutante C53S es sensible a los cambios de oxidoreducción, mientras que la C53A se une al DNA independiente de las condiciones redox. Estos datos indican que, contrario a lo que se ha observado en los dominios Myb de animales, en las plantas la C53 no es importante para la unión al DNA y, en efecto, ninguno de los cambios realizados en C53 afectó la actividad reguladora de P1 *in vivo*. Por su parte, las mutantes C49S y C49A se unen al DNA independientemente de las condiciones redox. En condiciones oxidantes *in vitro*, la C49 y la C53 forman un puente disulfuro que impide la unión del dominio Myb R2R3 al DNA (Heine et al. 2004). La formación de este puente disulfuro podría ser un punto de regulación de la actividad de unión al DNA de las proteínas Myb de plantas, que no se comparte con los dominios Myb de animales.

Las proteínas Myb también pueden ser modificadas a nivel post-traducciona por fosforilación, ubiquitinación, acetilación y sumoilación. Estas modificaciones ocurren tanto en el dominio Myb como en la región C terminal de la proteína y pueden afectar la actividad del factor Myb al alterar el nivel de la proteína, la unión al DNA o la capacidad de transactivación (Bergholtz et al. 2001; Ness 2003; Ramsay and Gonda 2008). En las plantas se ha visto que algunos genes *myb* también pueden ser blanco de microRNAs (miRNAs, en general inhiben la traducción) y de RNAs de silenciamiento que actúan en *trans* (ta-siRNAs, degradación del mRNA) (Dubos et al. 2010). Por ejemplo, los genes *AtMYB33*, *AtMYB35*, *AtMYB65* y *AtMYB101*, que participan en el desarrollo de las anteras y el polen, son blanco de miR159 (Allen et al. 2007). El TAS4-siR81(-) tiene como blanco al mRNA de los genes *AtMYB75*, *AtMYB90* y *AtMYB113*, los cuales están involucrados en el control de la biosíntesis de antocianinas (Rajagopalan et al. 2006).

1.2. Las proteínas Myb como reguladores de la diferenciación celular en los hongos.

En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* se identificó el gen *flbD* como miembro de la familia Myb. El dominio de unión al DNA de FlbD contiene dos secuencias repetidas con el arreglo estructural clásico de la proteína c-Myb, pero a diferencia de los dominios clásicos que contienen tres residuos de triptófano críticos espaciados cada 18 o 19 aminoácidos, FlbD presenta sólo dos triptófanos con una tirosina en la posición esperada para el tercer triptófano en la primera secuencia repetida, y una isoleucina en la posición esperada para el primer triptófano de la segunda secuencia repetida (Wieser and Adams 1995) (Figura 3). Tales sustituciones se han observado en otras proteínas Myb de plantas (Figura 3) que mantienen su función como activadores transcripcionales. FlbD contiene además el residuo de cisteína altamente conservado entre los miembros de la familia Myb en la secuencia repetida R2 (Figura 3), el cual se ha propuesto como mediador de la regulación redox sobre la unión de Myb al DNA (Myrset et al. 1993).

El gen *flbD* se expresa de manera constitutiva en las hifas vegetativas y en etapas tempranas del desarrollo asexual (Garzia et al. 2010; Wieser and Adams 1995). Recientemente se ha encontrado que FlbB, un factor de transcripción bZIP, activa la expresión de *flbD* y que ambos factores en conjunto activan la expresión del gen *brlA* (codifica para un factor de transcripción con dos dominios de dedos de zinc), el regulador primario de la conidiación en *A. nidulans* (Garzia et al. 2010).

			+		+	
<i>A. nidulans</i> FlbD	1	HRRGPWVPEEDQLLLQLVREQG				PNNN 26
<i>A. fumigatus</i> FlbD	1	HRRGPWVPEEDQLLLQLVREQG				PNN- 25
<i>N. crassa</i> RCA-1	1	QRRGPWSAGEDQRLIKLVKDLG				PGNW 26
<i>S. cerevisiae</i> Bas1	1	LKKGKWTQEEDEQLLKAYEEHG				PHWL 26
<i>U. maydis</i> Myb	1	HRKGSWTPSEDALLTKLMQKCNKPKTEKNGAKKQVNWVVAQHFERRNAK				50
<i>A. thaliana</i> GL1	1	YKKGLWTVVEEDNILMDYVLNHG				TGQW 26
<i>Z. mays</i> C1	1	VKRGAWTSKEDDALAAYVKAHG				EGKW 26
<i>H. sapiens</i> c-Myb	1	LIKGPWTKCEDQRVIELVOKYG				PKRW 26
			+		+	
<i>A. nidulans</i> FlbD	27	WVRISQHMHYRSPKQCRERYRQNLKPSLNR--DPISAEGLAIERMVNEM				74
<i>A. fumigatus</i> FlbD	26	WVRISQHMHYRSPKQCRERERHQLKPSLNR--EPISTEEGLMIERMVNEM				73
<i>N. crassa</i> RCA-1	27	VNVARILGTR-TPKQCRERWHQLKPLNH--GPMTEEEAALIVREVDLK				73
<i>S. cerevisiae</i> Bas1	27	S--ISMDIPGRTEDEQCAKRYIEVLGPGSKGRLREWTLLEDLNLISKVKAY				74
<i>U. maydis</i> Myb	51	DVSTNNYETFVAVVPECRKRWSSSLCPGISR--GSWTPSEDKLLQOGMOIY				98
<i>A. thaliana</i> GL1	27	NRIVRKTGLKRCGKSCRLRWNNYLSPNVNK--GNFTEQEEEDLIIRLHKL				74
<i>Z. mays</i> C1	27	REVPOKAGLRRCGKSCRLRWLNLYLFPNIRR--GNISYDEEDLIIRLHRL				74
<i>H. sapiens</i> c-Myb	27	S-VIAKHLKGRIGKQCRERWNNHLNPEVKK--TSWTEBEDRIIYQAHKRL				73
			+		+	
<i>A. nidulans</i> FlbD	75	GRCWAEIARRLGNRSDNAVKNWNGMNRKRGLQQSINSSPHSRTPHGR				124
<i>A. fumigatus</i> FlbD	74	GKRWAEIARRLGNRSDNAVKNWNGSMNRKRRLSATTTSPP--SRTFQGR				121
<i>N. crassa</i> RCA-1	74	GPRWADIARKLQGRSDNAVKNYWNGLNRRKKNQLRRQSAPRRVSASDVL				123
<i>S. cerevisiae</i> Bas1	75	GTKWRISSEMEFRPSLTCRNRWRKIITMVVRGQASEVITKAIKENKNID				124
<i>U. maydis</i> Myb	99	PGQWAKIATYVGTRTGDQCSSRWVLSGADWNEERDRILLDFVNRHGKR				148
<i>A. thaliana</i> GL1	75	GNRWSLIAKRVPGRTDNCVKNYWNTHLSKRL-----VGD				108
<i>Z. mays</i> C1	75	GNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNSTLGRAGAGAGAGGSSVWVVPADTGS				124
<i>H. sapiens</i> c-Myb	74	GNRWAEIAKLLPGRTDNLKNEWNSMTRKRV-----				104

Figura 3. Aminoácidos conservados en el dominio Myb R2R3 de distintos grupos filogenéticos. Se indica la longitud de la secuencia repetida R2 y R3 en color negro. Los asteriscos representan los residuos de triptófano o residuos aromáticos espaciados. El residuo de cisteína conservado dentro del dominio Myb, el cual está involucrado en la regulación redox de algunas proteínas Myb *in vitro* se indica en un rectángulo.

En el hongo *Neurospora crassa* se ha identificado el homólogo funcional del gen *flbD* de *A. nidulans*. Tal gen se denominó *rca-1* (regulador de la conidiación en *Aspergillus*) y codifica para una proteína de 229 aminoácidos que muestra un 57% de identidad con FlbD, en la región del dominio de unión al DNA. *rca-1* puede complementar el defecto de conidiación de la mutante en *flbD*; además la expresión forzada de *rca-1* induce la conidiación de *A. nidulans* en cultivos sumergidos como ocurre con la sobre-expresión de *flbD*. Sin embargo, la eliminación de *rca-1* en *N. crassa* no tuvo efecto sobre el crecimiento, la macroconidiación, la microconidiación o la formación de ascosporas (la mutante nula se comporta igual a la cepa silvestre como cepa femenina o masculina en cruces meióticas). El único fenotipo que presentó la mutante *rca-1* fue un crecimiento hifal recto o en contra de las manecillas del reloj, en comparación con la cepa silvestre,

donde se observa crecimiento espiral en el sentido de las manecillas del reloj (Shen et al. 1998).

En el hongo ascomiceto patógeno de plantas *Gibberella zeae* se encontraron dos genes que codifican para un posible factor de transcripción tipo Myb (*MYT1* y *MYT2*, respectivamente). *MYT1* se expresa de manera constitutiva durante el estado vegetativo y el desarrollo sexual, y su eliminación resulta en la producción de peritecios con ascosporas inmaduras cuando se realizan cruza homotálicas o en cruza con la mutante como cepa femenina. Una mutante nula no muestra un fenotipo en el crecimiento vegetativo, la producción de conidias, la germinación, la virulencia y la producción de micotoxinas. Sin embargo, la sobre-expresión de *MYT1* acelera la germinación y el crecimiento, y reduce la producción de micotoxinas en comparación a la cepa silvestre, indicando que *MYT1* reprime genes involucrados en el crecimiento vegetativo y el metabolismo secundario (Lin et al. 2011). Por su parte, *MYT2* regula el tamaño de los peritecios. La sobre-expresión de *MYT2* muestra fenotipos pleiotrópicos incluyendo la disminución en el crecimiento vegetativo, la producción de conidias, la virulencia y la producción de micotoxinas (Lin et al. 2012).

En *S. cerevisiae*, Bas1p contiene el dominio de unión al DNA localizado en la parte N-terminal de la proteína. Este dominio está compuesto de tres secuencias repetidas conteniendo residuos de triptófano altamente conservados (Figura 3), los cuales son esenciales para la unión al DNA y para su función *in vivo* (Pinson et al. 1998). Bas1p en conjunto con Bas2p, una proteína homeodominio, se requieren para activar la expresión de los genes de biosíntesis de AMP a partir de 5'fosforibosil-1-pirofosfato (genes ADE). La transcripción de esos genes se disminuye en presencia de adenina exógena en el medio. Por lo que se deduce que estos genes también se requieren para la regulación por adenina y además activan la expresión de tres genes involucrados en la vía de biosíntesis de histidina (Pinson et al. 2000a).

Además de los residuos de triptófano conservados, Bas1p contiene en la segunda secuencia repetida un residuo de cisteína, C153 que, como se ha mencionado, se conserva en muchos de los miembros de la familia Myb (Figura 3) y cuya reducción es crítica para la unión de c-Myb al DNA *in vitro* (Myrset et al. 1993). Al substituir C153 por aminoácidos cargados (C153R, C153K y C153D) se obtuvo una proteína carente de función *in vitro* e *in vivo*. En cambio, al reemplazarla con un residuo pequeño hidrofóbico (C153A, C153S y C153V) se obtuvo una proteína completamente funcional *in vitro* e *in vivo*. La C153 es accesible a un agente alquilante en la proteína libre y que se protege al ponerse en contacto con el DNA previamente, ya que al unirse al DNA se genera un cambio conformacional en el cual la cisteína queda empaçada en el núcleo hidrofóbico de la segunda secuencia repetida (Pinson et al. 2001), como ocurre en el caso de c-Myb. Adicionalmente, dentro del dominio de unión al DNA, Bas1p contiene otros dos residuos de cisteína, uno en cada secuencia repetida. La mutación de los residuos C82A y C206V en el primer y tercer segmento repetido respectivamente, y la combinación con la mutación C153V para la obtención de todas las combinaciones de substituciones sencillas, dobles y triples que mostraron complementación de una mutante *bas1* nula, sugirió que los residuos C82 y C206 no son importantes para la función de Bas1p, a diferencia del residuo C153 (Pinson et al. 2001). No obstante, se ha visto que la unión de Bas1p al DNA *in vitro* se inhibe completamente en presencia de diamida o selenito de sodio (Pinson et al. 2000b), lo que indica que Bas1p es susceptible a la oxidación, lo cual depende principalmente del residuo de cisteína C153 localizado en el segundo segmento repetido del dominio de unión al DNA, ya que la mutación C153V no impide la unión al DNA en presencia de diamida (hasta 2 mM) mientras que las substituciones C82A y/o C206V muestran sensibilidad silvestre a la oxidación por diamida y no se unen al DNA, estos cambios en combinación con la mutación en la C153V generan proteínas que son capaces de unirse al DNA de manera constitutiva *in vitro* en presencia de diamida, es decir que no está regulada por redox (Pinson et al. 2001).

Para demostrar la función de Bas1p *in vivo*, se reemplazaron los tres residuos de cisteína por residuos hidrofóbicos (C82A, C153V, C206V) lo cual produjo una proteína cuya capacidad de unión al DNA *in vitro* no se afectó en alta concentración de diamida. Sin embargo, en una mutante *BAS1* con las substituciones indicadas en las tres cisteínas, la expresión de los genes *ADE* se reprimió después del tratamiento con diamida, indicando una regulación redox *in vivo* no mediada por C82, C153 ó C206. Asimismo, la regulación redox de los genes *ADE* requiere la interacción de las proteínas Bas1p y Bas2p, la cual se bloquea en presencia de diamida (Pinson et al. 2000b), aunque tampoco depende de los residuos de cisteína presentes en Bas2p. En una mutante *BAS2* triple en los residuos de cisteína (C200A, C282A y C369S) en combinación con *BAS1* silvestre o una mutante triple *BAS1* (C82A, C153V, C206V) la expresión de los genes *ADE* se reprime en presencia de diamida (Pinson et al. 2000b).

2. *Aspergillus nidulans* como modelo experimental.

A. nidulans es un hongo filamentoso que pertenece al grupo de los ascomicetos, fue introducido por Guido Pontecorvo en 1950 como un modelo para realizar un amplio rango de estudios genéticos y que ha permitido estudiar la genética del crecimiento multicelular, la diferenciación celular y múltiples aspectos de la biología celular de los hongos filamentosos.

Algunas de las características que lo hacen un buen modelo en la investigación son el que presenta dos programas de desarrollo: un ciclo asexual (necesario para los experimentos de mutagénesis y transformación) y un ciclo sexual bien definido (esencial para el análisis de la genética clásica y el mapeo genético). Posee además una etapa parasexual lo que permite la formación de diploides estables, el análisis de alelismo, dominancia/recesividad y el mantenimiento de mutaciones letales. Los ciclos de vida son cortos y se pueden completar en el laboratorio en 2 ó 3 semanas; crece en medios de

cultivo definidos y en un amplio rango de temperaturas, para selección y rastreo de marcadores nutricionales y aislamiento de mutantes letales condicionales; es homotálico (no tiene sexos separados), es haploide, lo que facilita la selección de mutantes y el análisis Mendeliano en una sola generación. Tiene una enorme versatilidad metabólica lo que permite estudios de catabolismo y de biosíntesis. (Casselton and Zolan 2002; Todd et al. 2007). Se conoce la secuencia de su y está disponible en: (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html) (Galagan et al. 2005) y además se cuenta con un banco de mutantes auxótrofas y herramientas de genética molecular, así como algunos protocolos para trabajar con el hongo disponibles en el Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net>). Otras bases útiles para la investigación en *A. nidulans* son las siguientes: Central Aspergillus Data Repository (<http://www.cadre.man.ac.uk/>), mapas genéticos, lista de loci y nomenclatura (<http://.www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/aspergillus/>) y varios libros acerca de la investigación en *Aspergillus*.

Además de las ventajas prácticas de *A. nidulans* como organismo modelo, éste se encuentra filogenéticamente relacionado con especies de hongos de importancia económica (*A. oryzae* y *A. níger*) y clínica (*A. fumigatus*).

2.1. El desarrollo asexual en *A. nidulans*.

Después de la germinación de las conidias uninucleadas o de las ascosporas binucleadas, *A. nidulans* crece como células filamentosas o hifas vegetativas que forman una red interconectada denominada micelio. Las hifas vegetativas de dos individuos se pueden fusionar para formar un heterocarión, y los núcleos en un heterocarión o en un homocarión se pueden fusionar para formar individuos diploides. Durante la fase de crecimiento vegetativo las células adquieren la habilidad para responder a diversas señales, capaces de inducir el desarrollo. En condiciones apropiadas, algunas hifas

vegetativas detienen el crecimiento normal y se diferencian asexualmente para producir esporas o conidias, en estructuras específicas llamadas conidióforos (Adams et al. 1998). El desarrollo asexual se inicia con la diferenciación de una célula pie especializada de la cual emerge un tallo. Al final del tallo se forma una vesícula y dos gemaciones sucesivas producen células especializadas denominadas métulas y fiálides, respectivamente. Las esporas uninucleadas (conidiosporas) se producen a partir de las fiálides, mediante varias rondas consecutivas de mitosis (Figura 4). La conidiación se induce en respuesta a diferentes estímulos tales como el aire, la limitación de nutrientes, el estrés oxidativo, el estrés salino y el estrés osmótico (Adams et al. 1998; Etxebeste et al. 2008; Skromne et al. 1995; Timberlake and Clutterbuck 1994).

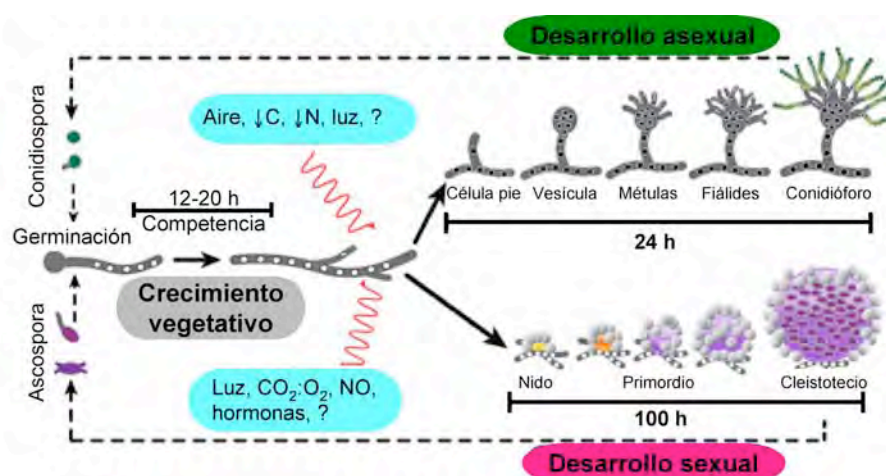


Figura 4. Diferenciación celular del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. El proceso de diferenciación es una respuesta a las diferentes señales ambientales y señales endógenas, no todas las señales han sido identificadas. Desarrollo asexual: proceso de formación de los conidióforos (superior); crecimiento vegetativo o polar a partir de una espora asexual o sexual (central); desarrollo sexual: producción de cuerpos fructíferos que contienen ascosporas en su interior (inferior). Modificado de (Bayram and Braus 2012).

2.1.1. El inicio de la conidiación: una respuesta al ambiente extracelular.

Durante varios años se han estudiado e identificado diversos factores reguladores que participan en la detección y transducción de los estímulos que inducen los cambios

morfogenéticos en *A. nidulans*, así como aquellos que están involucrados en la generación espacio temporal de los diferentes tipos celulares de un conidióforo (Adams et al. 1998; Etxebeste et al. 2010; Yu et al. 2006).

La proteína VeA integra las señales de la luz roja y la luz azul, así como el estado nutricional y el estado osmótico de la hifa; para producir respuestas tales como la regulación del metabolismo secundario, de la biosíntesis de manoproteína, del desarrollo asexual y del ciclo sexual. VeA se acumula en el núcleo de las hifas vegetativas en la oscuridad, mientras que en condiciones de luz se bloquea su transporte al núcleo, mediado por la alfa-importina (Araujo-Bazan et al. 2009). VeA nuclear reprime el desarrollo asexual en la oscuridad (Figura 5) (Stinnett et al. 2007), probablemente a través de diversas interacciones con proteínas reguladoras. El complejo VeA-VelB-VosA liga la respuesta a la luz roja y la luz azul con el desarrollo a través del fitocromo, el cual está integrado por la cinasa de histidina FAP, sensible a la luz roja y los receptores de luz azul *white-collar*, *LreA* y *LreB* (Figura 5) (Purschwitz et al. 2008; Purschwitz et al. 2009).

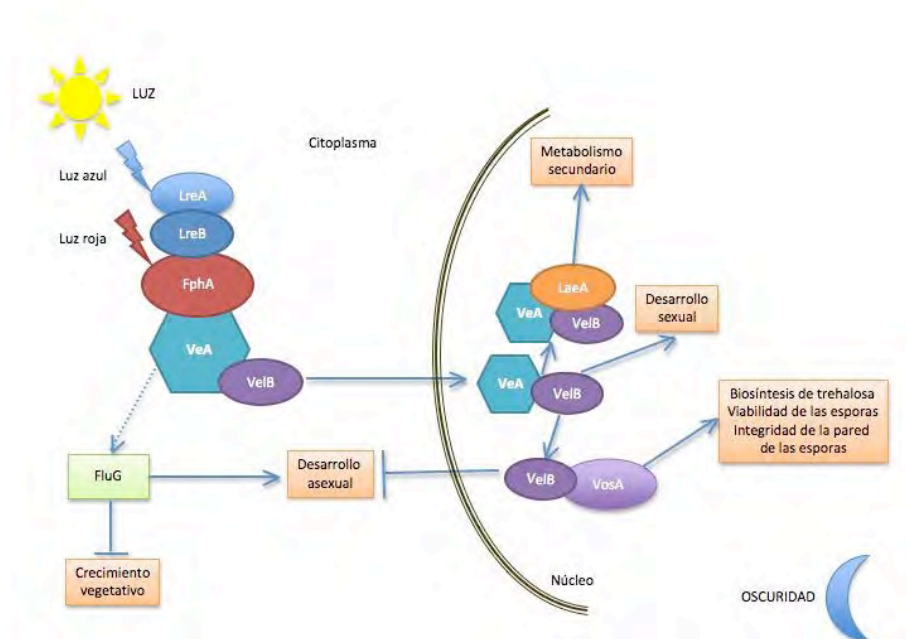


Figura 5. Modelo del papel del complejo VeA en el desarrollo y el metabolismo secundario en *A. nidulans*. En condiciones de luz, el receptor de la luz roja tipo fitocromo FphA interacciona con LreB, al que se une LreA. LreA y LreB son ortólogos de los receptores de luz azul tipo “*White Collar*” de *N. crassa*. FphA también interacciona con VeA y esta a su vez con la proteína VelB. Se ha propuesto que VeA activa a la proteína FluG (se indica con una línea punteada). En condiciones de oscuridad, VeA favorece el transporte de VelB al núcleo. VeA-VelB se requieren para inducir el desarrollo sexual. En el núcleo el dímero VeA-VelB interacciona con la metiltransferasa LaeA y ambos se requieren para la inducción de múltiples genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios. Además, VelB forma un dímero con VosA el cual se requiere para regular la síntesis de trehalosa y la integridad de la pared celular de las conidias. Modificado de Sarikaya Bayram et al., 2010; Calvo et al., 2008.

Además de la luz, la esporulación asexual en *A. nidulans* también se regula por señales químicas endógenas. La proteína FluG es la responsable de producir un factor de señalización extracelular de origen terpenoide, el dehidroaustinol, el cual parece acumularse en las hifas aéreas en forma de aducto con el diorcinol y señala la respuesta a una interfase aérea (Rodríguez-Urra et al. 2012), junto con otros compuestos no identificados (Márquez-Fernández et al. 2007; Soid 2006; Soid-Raggi et al. 2006). Se ha planteado la hipótesis de que una vez que la señal FluG se encuentra en niveles suficientes, se elimina el efecto represor del factor de transcripción tipo Gal-4 Zn(II)₂Cys₆ binuclear SfgA por un mecanismo desconocido, con lo que ocurre el cese en el crecimiento vegetativo y activación de los genes *flbB-flbE* en células vegetativas, para así continuar el proceso de conidiación (Figura 6) (Park and Yu, 2012; Seo et al. 2006). FlbA es un regulador de la vía de señalización de proteínas G heterotriméricas, que en su forma activa estimula la actividad de GTPasa de FadA, la subunidad alfa de la proteína G que señala el crecimiento, así FadA-GDP inhibe la disociación del complejo beta-gamma, SfaD-GpgA respectivamente, bloqueando el crecimiento vegetativo e induciendo la conidiación (Figura 6) (Etxebeste et al. 2010; Rosen et al. 1999; Yu et al. 1996).

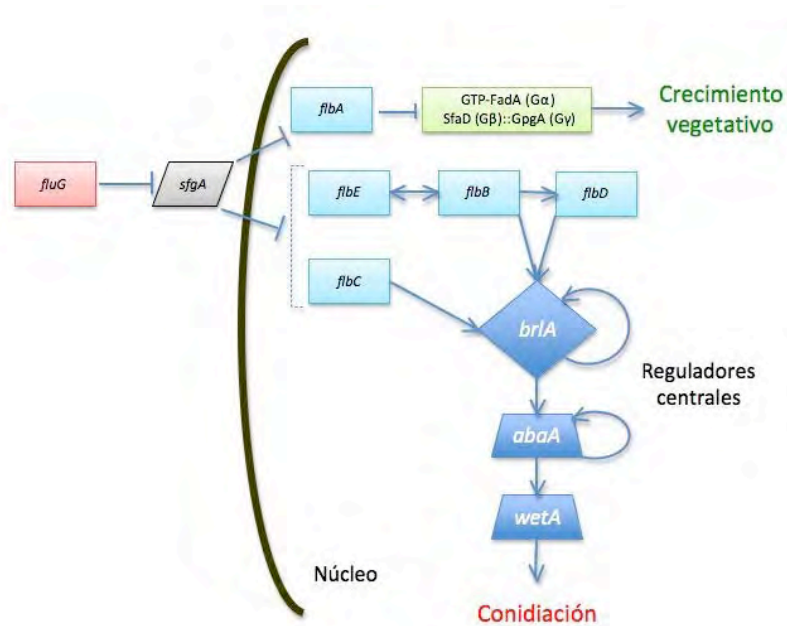


Figura 6. Modelo de la regulación de la esporulación asexual. En el texto se detallan las características de los reguladores iniciales. Esta vía converge en la regulación de la expresión del factor *brlA*, el regulador principal que desencadena la activación de la vía central de la conidiación. La mayoría de los componentes identificados en esta vía son factores de transcripción con diferentes dominios de unión al DNA. Modificado de Park and Yu, 2012.

2.1.2. El programa de desarrollo: la construcción del conidióforo.

Una vez que se inicia el proceso de la conidiación con la actividad de la proteína FlUG y la localización citoplásmica de VeA, se desencadena la acción de diversos factores reguladores que actúan por arriba del gen *brlA* (genes *flbB-flbE*) y cuya mutación produce una morfología algodonosa (*fluffy*) y un retraso notable en el desarrollo asexual (Wieser et al. 1994).

FlbB es un factor de transcripción del tipo bZIP que se localiza en el núcleo apical de la hifa vegetativa (Etxebeste et al. 2008) y durante la mitosis se dispersa en el citoplasma mientras que en condiciones conidiogénicas se distribuye a todos los núcleos de las células aéreas, la vesícula y las métulas, indicando una función en la transición para la producción de las fiálides y las conidias (Etxebeste et al. 2009). FlbB también se localiza

en la punta de las hifas vegetativas formando un complejo con FlbE durante etapas tempranas del crecimiento vegetativo (Garzia et al. 2009). *flbE* codifica para una proteína pequeña con dos dominios conservados aún no caracterizados, FlbE y FlbB son funcionalmente interdependientes y se propone que regulan la transición del crecimiento vegetativo a la conidiación (Garzia et al. 2009; Kwon et al. 2010a). Adicionalmente, FlbB se requiere para activar la expresión de *flbD* que, como ya se ha indicado, codifica para un FT de la familia Myb (Garzia et al. 2010; Wieser and Adams 1995). FlbD y FlbB forman un complejo en el núcleo y activan la expresión del gen *brlA* y la conidiación (Garzia et al. 2010). FlbC es un FT tipo dedos de zinc C_2H_2 que se une al promotor de *brlA in vitro* y los altos niveles de expresión de *flbC* correlacionan con el cese de la extensión apical y el hinchamiento de la vesícula del conidióforo, lo cual también se observa al sobre-expresar *flbC* (Kwon et al. 2010b). Otras tres mutaciones con desarrollo asexual retrasado definen los genes *tmpA*, *afeA* y *fluF*. *tmpA* codifica para una flavoenzima que se requiere para la producción de una señal química independiente de la que produce la proteína FluG (Soid-Raggi et al. 2006). *afeA* codifica para una enzima formadora de adenilato relacionada con las 4-cumarato ligasas (4-coumarate ligase like enzyme) y cuya función podría ser la síntesis de un metabolito secundario que actuaría como una molécula señal para inducir la conidiación (Soid 2006). La mutante *fluF1* se aisló después de tratamiento con 5-azacitidina (Tamame et al. 1983). La mutación se localizó en el cromosoma VIII (Tamame et al. 1988) pero la identidad del gen no ha sido descubierto hasta ahora.

Varios reportes indican que todos los genes *flbB-flbE* se requieren colectivamente para la producción de una segunda señal extracelular no identificada que actúa por debajo de la señal sintetizada por la proteína FluG (Adams et al. 1998; Etxebeste et al. 2008; Garzia et al. 2009).

2.1.3. La decisión final: la conidiogénesis.

El paso esencial para el desarrollo del conidióforo es la activación del gen *brlA* que codifica para un factor de transcripción de dedos de zinc C₂H₂, y el cual induce la expresión de otros genes requeridos para el desarrollo asexual por debajo de BrlA en una forma jerárquica (Figura 6). Las mutantes de pérdida de función de *brlA* crecen de manera indeterminada sin producir los otros tipos celulares necesarios para la esporulación. En contraste, la sobre-expresión de *brlA* en células vegetativas causa el cese del crecimiento polar y la formación de esporas viables a partir de las puntas de las hifas, diferenciadas de manera similar a una fiálide. Esto demuestra que la activación de *brlA* al final de la fase de elongación del tallo del conidióforo es el principal punto de control para el inicio de la conidiación (Adams et al. 1988).

Un gen activado por BrlA es *abaA*, el cual codifica para un factor de transcripción tipo ATTS que se activa después de la diferenciación de las métulas y regula la diferenciación de las fiálides (Andrianopoulos and Timberlake 1991; Sewall et al. 1990a). AbaA activa la expresión del gen *wetA*, el cual se requiere para la pigmentación de las conidias y para la síntesis de componentes de la pared celular cruciales para la integridad de las mismas (Marshall and Timberlake 1991; Sewall et al. 1990b). Estos tres genes definen una vía central que regula el desarrollo y junto con otros genes regulan la expresión de genes específicos de la conidiación y determinan la secuencia de activación durante el desarrollo del conidióforo y la maduración de las esporas (Adams et al. 1998; Mirabito et al. 1989). En efecto, las mutantes afectadas en alguno de estos genes están bloqueadas en distintas etapas del proceso de desarrollo.

Existen mecanismos de regulación interdependiente entre los reguladores centrales de la conidiación; BrlA activa la expresión de *abaA* y *wetA* (Mirabito et al. 1989), pero *abaA* también regula su propia expresión en métulas y fiálides, y reprime la expresión de *brlA* a bajos niveles, mientras que a altos niveles tiene un papel positivo

(Aguirre 1993). Además, *wetA* se autorregula de forma positiva (Aguirre 1993; Mirabito et al. 1989). Otros FT que participan en el desarrollo asexual incluyen *StuA* y *MedA*, los cuales modulan la actividad espacial y temporal, respectivamente, de los reguladores centrales (Adams et al. 1998). En adición, los reguladores de la respuesta *SrrA* y *SskA* del sistema de fosfo-relevo son necesarios para la activación de *brlA* y la esporulación normal (Vargas-Perez et al. 2007), y la vía general de señalización de estrés *SakA-AtfA* también participa en el proceso de desarrollo normal de las esporas (Lara-Rojas et al. 2011).

Recientemente, se ha identificado un nuevo regulador, *VosA*, el cual actúa en conjunto con los genes reguladores centrales, acopla la biosíntesis de la trehalosa y la maduración de las conidias, y regula negativamente la expresión de *brlA*, con lo que se termina la conidiación en *A. nidulans* (Ni and Yu 2007).

2.2. El desarrollo sexual en *A. nidulans*.

El desarrollo de los cuerpos fructíferos en los hongos ascomicetos filamentosos es un proceso de diferenciación celular complejo que requiere condiciones ambientales especiales y que está controlado por muchos genes reguladores del desarrollo (Poeggeler 2006). En *A. nidulans* la reproducción sexual ocurre después de la diferenciación asexual y se induce por limitación de oxígeno y ausencia de luz (Figura 4). Este hongo es homotálico y por autofertilización una colonia produce cleistotecios que contienen hasta 1000 ascosporas.

La primer manifestación morfológica de la formación de un cleistotecio es la aparición de una estructura simple y débilmente enrollada llamada ascogonia, en la cual participan dos hifas parentales que se fusionan para producir un dicarion. Después de la fertilización, la ascogonia es rodeada por hifas que crecen de manera desordenada, las cuales forman una especie de nido de gran tamaño; y se diferencian células

multinucleadas globosas denominadas células Hülle, las cuales parecen nutrir a lo largo del desarrollo. Las hifas que formaron el nido más tarde se diferencian en lo que es la pared (peridio) del cleistotecio (Figura 4). Debajo de las células Hülle, cada dicarion lleva a cabo la fusión nuclear seguida de meiosis y mitosis postmeiótica, lo que resulta en la formación de ascas (Sohn 2002). Las ascas se originan de bastones que se forman por división simultánea de los dos núcleos de la célula terminal de una hifa ascógena. El bastón incluye una célula con punta uninucleada, una célula penúltima binucleada y una célula basal uninucleada. El asca se forma por alargamiento de la penúltima célula, lo cual se acompaña por la fusión de sus dos núcleos para formar un cigoto diploide transitorio. El núcleo del cigoto se divide meióticamente para producir 4 núcleos que a través de una primera mitosis post-meiótica producen 8 núcleos separados por una membrana que darán origen a 8 ascosporas uninucleadas dentro de cada asca. Una segunda mitosis post-meiótica produce finalmente 8 ascosporas maduras binucleadas (G. H. Braus, Krappmann, S., Eckert, S.E. 2002). La célula basal y la punta se fusionan para generar una célula binucleada, la cual forma un segundo bastón y el proceso se repite. Cada cleistotecio contiene hasta 10,000 ascosporas. Todas las ascosporas dentro de un solo cleistotecio pueden ser de origen “self” o de autofecundación o bien de origen híbrido.

2.2.1. Las señales ambientales y endógenas que regulan la diferenciación sexual: la luz, los nutrientes, el estrés y las hormonas.

Diversos factores externos influyen sobre la formación de los cuerpos fructíferos en *A. nidulans*, los cuales incluyen: el pH del medio (pH 6.0-6.5), la aeración (una elevada concentración de CO₂ es favorable), la temperatura, la presión osmótica (los niveles altos de sal inhiben el desarrollo sexual), la luz (la oscuridad es favorable), la presencia y disponibilidad de minerales (fósforo), una proporción balanceada de carbono y nitrógeno, y la disponibilidad de aminoácidos (la privación de aminoácidos bloquea el desarrollo en el estado de microcleistotecio). Además, están involucrados los factores derivados de lípidos

(oxilipinas) producidos por el propio hongo (Tsitsigiannis et al. 2004b; Tsitsigiannis et al. 2004a). Recientemente, se ha visto que el óxido nítrico promueve la producción de cleistotecios (Baidya et al. 2011).

La influencia de la luz sobre los procesos de desarrollo se ha estudiado ampliamente en *A. nidulans*. Se han identificado una serie de genes que responden a la luz: el gen *fphA* codifica para un fotocromo que percibe la luz roja, los genes *lreA* y *lreB* codifican para los homólogos de *white collar* que perciben la luz azul y el gen *cryA* codifica para un criptocromo que percibe la luz azul y la luz UVA. El análisis de la eliminación de estos genes indica que FphA y CryA reprimen la reproducción sexual en condiciones de luz roja y de luz UVA/luz azul, respectivamente (Bayram et al. 2008a; Blumenstein et al. 2005). En contraste, las proteínas LreA y LreB activan la reproducción sexual en la oscuridad y reprimen la diferenciación en presencia de luz (Purschwitz et al. 2008). La formación del complejo nuclear regulador de luz integrado por VeA, LreA, LreB y FphA permite el balance entre el desarrollo asexual y el sexual en varias condiciones de luz/oscuridad (Bayram et al. 2010).

El complejo “*velvet*” también tiene un papel fundamental para regular el balance hacia el desarrollo sexual dependiente de la presencia de luz/oscuridad (Figura 5). Este complejo está integrado por las proteínas VeA, VelB y LaeA, además de las proteínas de andamiaje VosA, VipA, VipB y VipC (Bayram and Braus 2012). La función de este complejo es activar el desarrollo sexual en la oscuridad mientras que bloquea la conidiación (Figura 5). La eliminación del gen *veA* resulta en inhabilidad para la reproducción sexual (Kim et al. 2002), e inactivación de la expresión del gen de la oxilipina *ppoA* (Tsitsigiannis et al. 2004a), mientras que la sobre-expresión de *veA* favorece la reproducción sexual en medio osmótico y cultivo líquido, condiciones que normalmente son inapropiadas (Kim et al. 2002). Adicionalmente, VeA interactúa a manera de puente entre las proteínas VelB y LaeA. VelB muestra homología con la proteína VeA, y una mutante nula es incapaz de formar cleistotecios aún en la oscuridad (Bayram et al. 2008b). Se ha encontrado que VelB

interactúa con VosA para regular la producción de trehalosa en las conidias y las ascosporas, lo cual afecta la viabilidad de las esporas (Figura 5) (Bayram et al. 2008b; Ni and Yu 2007).

VeA también interactúa con el regulador global del metabolismo secundario, LaeA, una metiltransferasa (Figura 5) (Bayram and Braus 2012). LaeA se necesita para mediar la inhibición sexual por luz. La eliminación de *laeA* resulta en un incremento en la producción de cleistotecios en la luz y en la oscuridad, aunque de menor tamaño que los de una cepa silvestre; en un menor número de células Hülle y en la inhibición de la actividad de mutanasa, elementos que son necesarios para mantener el desarrollo de los cuerpos fructíferos. De acuerdo a estos datos, LaeA suprime el desarrollo sexual en presencia de luz pero lo promueve en la oscuridad (Bayram and Braus 2012; Sarikaya Bayram et al. 2010). Finalmente, se ha demostrado que VeA también interacciona con la importina nuclear KapA, lo que ha llevado a proponer un modelo de interacción entre VeA, VelB y KapA, los cuales se transportan al núcleo en la oscuridad, donde podría darse la interacción con LaeA y llevar al desarrollo sexual y a la producción de metabolitos secundarios (Figura 5) (Bayram and Braus 2012).

La proteína cinasa ImeB también está involucrada en la inhibición del desarrollo sexual mediado por la luz (Figura 7). Una mutante nula *imeB* produce un elevado número de cleistotecios en presencia de luz y forma células Hülle en cultivos sumergidos, mientras que una mutante con sobre-expresión de la cinasa produce una enorme cantidad de cuerpos fructíferos independientemente de la luz (Bayram et al. 2009). Recientemente se ha identificado una proteína relacionada a *velvet*, VelC, que actúa incrementando el desarrollo sexual de *A. nidulans*. Así, la sobre-expresión de *velC* causa una mayor producción de cleistotecios mientras que su eliminación resulta en incremento del desarrollo asexual y una disminución de la producción de cuerpos fructíferos (Sarikaya Bayram et al. 2010). Finalmente, se han identificado dos proteínas con dominios dedos de

zinc, SilA y SilG, las cuales actúan como represores del desarrollo sexual en la luz (Figura 7) (Dyer and O'Gorman 2012).

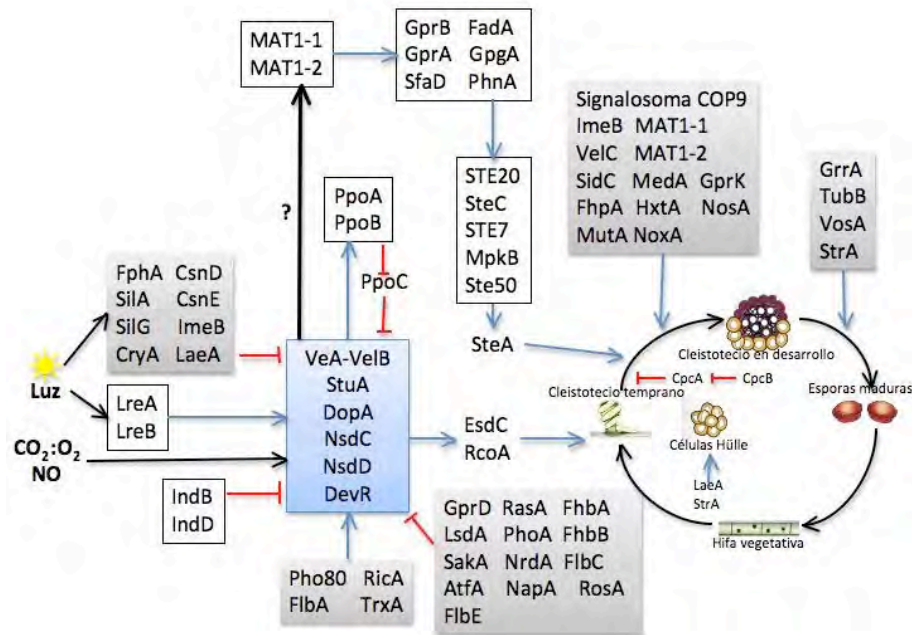


Figura 7. Vías que regulan el desarrollo sexual en *A. nidulans*. Se muestran las interrelaciones propuestas entre los genes involucrados en la reproducción sexual. En el texto se detallan las características de los productos génicos específicos. Las proteínas ubicadas en el mismo cuadro o área sombreada se presume que actúan en el mismo estado de desarrollo, pero el orden en el que actúan o la naturaleza de sus interacciones se desconocen. El inicio cleistotecial se refiere a un estado temprano del desarrollo del cleistotecio. Algunos genes participan en múltiples etapas del ciclo sexual. Las líneas azules indican activación y las líneas rojas indican represión. Modificado de Dyer y O'Gorman, 2011.

El desarrollo sexual en *A. nidulans* requiere de un buen estado nutricional, así los genes *cpcA* y *cpcB* se encargan de percibir los niveles de aminoácidos y ante la limitación de éstos se forman microcleistotecios (Figura 7). El gen *lsa* percibe las condiciones de sal elevada, lo cual inhibe la producción de cleistos. El gen *imeB* tiene una posible función en suprimir el desarrollo sexual en bajas concentraciones de glucosa. La ciclina An-Pho80 promueve la diferenciación sexual a bajas concentraciones de fósforo (Dyer and O'Gorman 2012). Se ha identificado un gen involucrado en el desarrollo sexual temprano,

esdC, el cual codifica para una proteína con dominio de unión a glucógeno, lo que sugiere podría percibir los niveles de carbono y el estado metabólico (Han et al. 2008).

El estrés inducido por óxido nítrico también puede activar la reproducción sexual (Figura 7). Se ha observado que en presencia de óxido nítrico hay un incremento en la producción de cleistotecios y la expresión de genes reguladores tales como *nsdD* y *steA*. Asimismo, los genes *fhbA* y *fhbB* que codifican para flavo-hemoglobinas, las cuales desintoxicarían del óxido nítrico, y suprimen el desarrollo sexual en esas condiciones de estrés (Baidya et al. 2011).

En *A. nidulans* el cambio en el programa de desarrollo de la etapa asexual a la sexual requiere de determinados eventos fisiológicos, algunos de éstos han sido estudiados y se han identificado los genes involucrados en estos procesos. Dentro de éstos se encuentran la síntesis de las hormonas oxilipinas denominadas factores Psi (*precocious sexual inducers*) que se derivan del ácido linoleico y están relacionados con las prostaglandinas de los mamíferos. Los miembros *psiB α* y *psiC α* activan el cambio del desarrollo asexual a sexual, mientras que *psiA α* reprime el desarrollo sexual e induce la reproducción asexual (Champe et al. 1994; Tsitsigiannis et al. 2004b). Posteriormente, se identificó la participación de tres genes biosintéticos de oxilipinas, *ppoA*, *ppoB* y *ppoC* (*psi factor producing oxygenase*) que codifican sintetas de diol linoleato. La eliminación de *ppoA* resulta en la reducción de la producción de ascosporas pero también en un incremento de la esporulación asexual, mientras que su sobre-expresión incrementa la reproducción sexual (Figura 7) (Tsitsigiannis et al. 2004a). La eliminación de *ppoB* conduce a una disminución de la producción de cleistotecios contrario a lo que ocurre con la eliminación de *ppoC* (Tsitsigiannis et al. 2005).

El estado de oxidación celular es otra señal fisiológica para la morfogénesis sexual. En *A. nidulans* el gen *noxA* codifica para una NADPH oxidasa encargada de producir especies reactivas de oxígeno (EROs). Una mutante $\Delta noxA$ está bloqueada al inicio del

desarrollo sexual y sólo produce primordios sexuales (Lara-Ortiz et al. 2003). Esto sugiere que *noxA* contribuye a generar un estado hiperoxidante que activa la proliferación y la diferenciación celular (Figura 7). La expresión de *noxA* es independiente de la actividad de las proteínas SteA y StuA pero se reprime por la cinasa SakA (Lara-Ortiz et al. 2003). Para contener con un estado hiperoxidante durante el proceso de diferenciación sexual, *A. nidulans* cuenta con las catalasas A/B/C (Kawasaki et al. 1997; Kawasaki and Aguirre 2001; Navarro et al. 1996) y una catalasa peroxidasa codificada por el gen *cpeA* (Scherer et al. 2002) y además un sistema de tiorredoxina citoplásmico integrado por las proteínas TrxA y TrxR (Thon et al. 2007). La eliminación de *trxA* resulta en incapacidad para formar alguna estructura sexual, lo cual puede remediarse al adicionar niveles bajos de glutatión reducido (Thon et al. 2007), mientras que la eliminación de las catalasas A/B/C genera una gran cantidad de cleistotecios maduros aunque de menor tamaño (Lara-Ortiz, 2004), estos datos indican la importancia del balance del estado celular redox para que ocurra la diferenciación sexual. También ligado al estado redox de la célula se ha encontrado que la homeost homeostásis del hierro es vital para la formación de cleistotecios. El gen *sidC* que codifica para una sintetasa de péptidos no ribosomales, se necesita para la síntesis de un sideróforo intracelular (quelante de hierro); una mutante nula en *sidC* es incapaz de formar cuerpos fructíferos aún cuando se le suplemente el hierro (Eisendle et al. 2006).

2.2.2. El proceso de apareamiento.

Los genes de apareamiento, *MAT*, tienen un papel en la determinación de la identidad en las especies heterotálicas, pero son importantes en los procesos de desarrollo sexual tanto en las especies heterotálicas como en las homotálicas. *A. nidulans* es homotálico y posee las dos clases de genes *MAT*, que se denominan *MAT1* y *MAT2*. La eliminación de cualquiera de estos genes resulta en una disminución en la producción de cleistotecios de menor diámetro y sin ascosporas. Mientras que la sobre-expresión de ambos genes resulta en el arresto del crecimiento vegetativo y en el desarrollo de

cleistotecios en medios no favorables (Paoletti et al. 2007). Es posible que los genes *MAT* se expresen de manera diferencial en los núcleos que forman el dicarion sexual original y tengan un papel en la determinación de la identidad nuclear para así permitir la fusión nuclear (Debuchy 2010; Dyer and O'Gorman 2012).

Los genes *MAT* además regulan la producción de feromonas, las cuales están involucradas en la atracción quimiotáctica entre las células de apareamiento (Figura 7). En *A. nidulans* se ha identificado únicamente la feromona tipo alfa y los dos receptores acoplados a proteínas G que la reconocen, *gprA* y *gprB*. La carencia de alguno de ellos resulta en la producción de cleistotecios pequeños que contienen pocas ascosporas, mientras que la falta de ambos receptores resulta en la completa esterilidad (Han et al. 2004). Estos datos indican que la señalización por las feromonas es necesaria para la fertilización y la cariogamia nuclear.

2.2.3. Las vías de transducción de señales.

En *A. nidulans* se han identificado una gran variedad de vías de transducción de señales acopladas a proteínas G involucradas en los diferentes procesos de diferenciación celular. Particularmente, se ha encontrado una cascada de MAP cinasas encargada de percibir las feromonas. Los receptores GrpB y GrpA están ligados a la proteína G heterotrimérica compuesta por las subunidades alfa (FadA), beta (SfaD) y gamma (GpgA) (Figura 7). La carencia de alguna de las subunidades impide la formación de cleistotecios aunque si hay células Hülle en algunas condiciones (Rosen et al. 1999; Seo et al. 2005). La actividad de GTPasa de la proteína FlbA, la cual regula la señalización de la proteína G, se necesita para el desarrollo de las células Hülle y de los cleistotecios; ya que una mutante $\Delta flbA$ muestra un fenotipo *fluffy* autolítico en condiciones favorables para el desarrollo sexual (Han et al. 2001). Una proteína parecida a una fosducina, PhnA, también se

requiere para mediar la señalización $G\beta\gamma$, posiblemente, actuando como chaperona. La eliminación de *phnA* bloquea el desarrollo sexual (Seo et al. 2006).

La señalización mediada por proteínas G se transduce a través de una cascada de MAP cinasas que consiste de elementos consecutivos con actividad de cinasa identificados por su similitud con los componentes de la vía de transducción en *S. cerevisiae*, esencial para la reproducción sexual: *STE20* (MAPKKKK), *steC* (MAPKKK), *STE7* (MAPKK), *mpkB* (MAPK), que finalmente activan la proteína homeodominio SteA y el desarrollo sexual (Figura 7). La carencia de alguno de estos genes en *A. nidulans* resulta en esterilidad (Dyer and O'Gorman 2012; Paoletti et al. 2007).

Adicionalmente, se ha identificado otra cascada de señalización integrada por la proteína G pequeña, RasA, la cual en niveles normales modula la esporulación asexual, mientras que su sobre-expresión resulta en un fenotipo acleistotecial. Estas observaciones indican que RasA debe estar inactiva antes de iniciar la formación de los cuerpos fructíferos (G. H. Braus, Krappmann, S., Eckert, S.E. 2002). Otro gen que codifica un receptor acoplado a proteínas G, denominado *gprD*, regula negativamente el desarrollo sexual por arriba de la señalización de GprA/GprB (Seo et al. 2005). Un receptor más, GprK, también es esencial para la formación de los cleistotecios, una mutante nula está bloqueada en el desarrollo de los cleistotecios aunque produce cúmulos de células Hülle (Dyer and O'Gorman 2012). También una proteína relacionada a la actividad de proteínas G, GibB, homóloga de la subunidad $G\beta$ de RACK1, está involucrada en la producción de cleistotecios de tamaño, forma y pigmento normal, así como en la formación de ascosporas (Dyer and O'Gorman 2012). Adicionalmente, RicA un homólogo de la proteína RIC-8 de animales, es importante para el intercambio GDP/GTP en ausencia de los receptores acoplados a proteínas G, regula la producción de estructuras sexuales (Kwon et al. 2012).

Finalmente, las señales de estrés osmótico y de estrés oxidativo se perciben a través de la MAP cinasa SakA (HogA) (Kawasaki et al. 2002). Una mutante nula en *sakA* muestra desarrollo sexual prematuro e incremento en la producción de cleistotecios. En condiciones de estrés SakA reprime la diferenciación dependiente de *steA* (Kawasaki et al. 2002). SakA interactúa con el factor de transcripción AtfA, y una mutante con la eliminación de *atfA* resulta en desrepresión del desarrollo sexual (Figura 7) (Lara-Rojas et al. 2011). Adicionalmente, la eliminación del factor de transcripción NapA que integra la respuesta antioxidante también conduce a la desrepresión del desarrollo sexual, lo que sugiere que se necesita el balance de la respuesta antioxidante para la producción de cuerpos fructíferos en *A. nidulans* (Lara-Rojas 2012).

2.2.4. La regulación del desarrollo sexual.

Diversas proteínas reguladoras del desarrollo sexual muestran actividad como factores transcripcionales. Los primeros reguladores identificados por su participación en el desarrollo asexual fueron los genes *stuA* y *medA*, los cuales codifican para proteínas con una región bHLH y un dominio APSES, respectivamente. Sin embargo, estos genes también se requieren para el desarrollo sexual, como lo sugiere el hecho de que las mutantes en estos genes no producen cleistotecios. Cabe hacer notar que mutantes en *medA* sí producen células Hülle (Busby et al. 1996; Wu and Miller 1997). Los genes *devR* y *dopA* que codifican para una proteína bHLH y una proteína bZIP, respectivamente, son necesarios para el desarrollo asexual normal y además son esenciales para el desarrollo sexual, una mutante nula en estos genes no forma células Hülle ni cleistotecios (Tuncher et al. 2004; Pascon et al. 2000). La proteína RcoA de la familia WD40 se requiere para ambos procesos de desarrollo (asexual y sexual); en la diferenciación sexual actúa por debajo de VeA. Una cepa $\Delta rcoA$ es completamente estéril en autofecundación y no forma el tejido femenino en cruza (Todd et al. 2006). Por su parte, el factor de transcripción de dedos de zinc F1bC, y el regulador F1bE, que forman parte de los activadores que regulan la

conidiación, actúan como represores del desarrollo sexual (Figura 7). Las mutantes nulas en los genes de estos factores muestran una abundante formación de células Hülle y de cleistotecios (Kwon et al. 2010a; Kwon et al. 2010b).

Por otro lado, se han identificado genes que participan de forma exclusiva en la reproducción sexual: el gen *nsdD* (never in sexual development, NSD) codifica para un factor de transcripción dedos de zinc tipo GATA. Las mutantes $\Delta nsdD$ no producen células Hülle o cleistotecios en condiciones favorables para el desarrollo, mientras que la sobreexpresión de *nsdD* conduce a un incremento dramático en la producción de cleistotecios aún en medio con estrés salino, lo que indica que NsdD actúa como un regulador positivo del desarrollo (Figura 7) (Han et al. 2001). Un segundo gen relacionado a NSD, *nsdC*, que también codifica para un factor de transcripción dedos de zinc, parece tener un papel positivo en la regulación de los estados iniciales del desarrollo sexual (Figura 7) y su sobreexpresión favorece el desarrollo en condiciones inadecuadas como la luz blanca y el estrés osmótico (Kim et al. 2009).

NosA y RosA, las cuales son proteínas de la familia de dedos de zinc también regulan el desarrollo sexual (Figura 7). Las mutantes $\Delta nosA$ están bloqueadas en la etapa de primordio sexual (Vienken et al. 2006), mientras que en las mutantes $\Delta rosA$ se favorece el desarrollo en condiciones de baja glucosa y alta osmolaridad (Vienken et al. 2005). Se ha propuesto que VeA, NsdD, RosA y NsdC actúan en el desarrollo temprano y controlan los genes que inducen la formación del primordio sexual, mientras que NosA se requiere para la maduración de los primordios (Dyer and O'Gorman 2012).

Otro regulador del desarrollo sexual es el complejo del "signalosome" (CSN), COP9 que consiste de 8 subunidades. El CSN completo se necesita para la diferenciación sexual normal y también para reprimir el desarrollo sexual en presencia de luz (Figura 7) (G. H. Braus et al. 2010). Cand1, una proteína adicional involucrada en la nediación, una

modificación semejante a la ubiquitinación de proteínas, parece estar relacionada con el CSN y se requiere para el desarrollo sexual normal (Dyer and O'Gorman 2012).

2.2.5. La producción y la maduración de las ascosporas.

La etapa final del desarrollo sexual en *A. nidulans* incluye la producción y maduración de las ascosporas. Se ha determinado que entre 50 a 100 genes pueden estar específicamente involucrados en la formación de las ascosporas (Swart et al. 2001). Dentro de los pocos genes estudiados se encuentra el gen *tubB*, que codifica para la proteína alfa-tubulina, cuya mutación genera un bloqueo en la cariogamia y/o meiosis después de la formación del cigoto, por lo que se producen ascosporas con un solo núcleo (Kirk and Morris 1991). La proteína F-box GrrA, posiblemente involucrada en la ubiquitinación y la degradación de las proteínas, se requiere para llevar a cabo la meiosis y la formación de las ascosporas, pero no para la producción de células Hülle y de los cleistotecios (Krappmann et al. 2006). Como se mencionó anteriormente, el gen *vosA* se requiere para la producción de trehalosa en las esporas sexuales. Una mutante nula en este gen produce cleistotecios pequeños que contienen pocas esporas viables semi-transparentes (Ni and Yu 2007).

Por otro lado, la proteína de andamiaje StrA tiene un papel positivo en el desarrollo sexual (Figura 7), tanto en la formación de los cuerpos fructíferos y de las ascosporas como en la maduración de las mismas. Una función adicional para StrA es la señalización por calcio en el sistema endomembranal (Wang et al. 2010).

2.2.6. Los componentes estructurales de los cuerpos fructíferos o cleistotecios.

La formación de los cuerpos fructíferos maduros involucra la diferenciación de muchos tipos celulares diferentes, además de las células que participan en la cariogamia y la meiosis. Dado que en los hongos la pared celular es lo que da forma a la estructura de la células, se requiere de una regulación coordinada de las enzimas involucradas en la biogénesis de la pared celular y el metabolismo durante el desarrollo sexual. Se han identificado varios genes que participan en este proceso de desarrollo, tales como los genes involucrados en la pigmentación, las sintasas de quitina y los genes del metabolismo de carbohidratos de la pared celular (Poeggeler 2006).

La quitina, uno de los componentes característicos de la pared celular de los hongos, se sintetiza por las enzimas sintasas de quitina. En *A. nidulans* se han estudiado tres genes que codifican sintasas de quitina *chsA*, *chsB* y *chsC*. El gen *chsA* se expresa únicamente durante la esporulación asexual, *chsB* se expresa en todos los estados de crecimiento y de desarrollo, mientras que *chsC* se expresa durante el crecimiento vegetativo temprano así como en los cleistotecios y las ascosporas (J. I. Lee et al. 2004).

Los carbohidratos son otro constituyente importante de la pared celular de los hongos y es el beta-1,3-glucano el componente principal dentro de estos. Los carbohidratos no solo son elementos estructurales si no que también funcionan como reserva almacenada en forma de alfa-1,3-glucano durante el crecimiento vegetativo y que se utilizan como fuente de carbono para el desarrollo sexual. El gen *mutA* que codifica para una alfa-1,3-glucanasa se expresa durante la diferenciación sexual y degrada alfa-1,3-glucano para dar glucosa. Las mutantes en *mutA* son capaces de formar cleistotecios, lo que sugiere que otras formas de carbohidratos pueden utilizarse durante la formación de los cuerpos fructíferos (Wei et al. 2001; Wei et al. 2004).

Las células en desarrollo requieren de un sistema de transporte que permita la utilización de los carbohidratos que proporcionen una fuente de carbono para la formación de los cuerpos fructíferos. Se ha descrito un transportador para hexosas localizado en la hifa ascógena, aunque el gen *hxtA* que codifica para este transportador no es esencial para el desarrollo sexual (Wei et al. 2004).

Otros componentes de la pared celular son los pigmentos producto de las melaninas. Las melaninas estabilizan la pared celular y ofrecen protección contra el daño al DNA inducido por la luz UV y las EROs. En los hongos patógenos de las plantas las melaninas son necesarias para la penetración del apresorio en el tejido de la planta y, en general, para la patogenicidad de varios hongos que afectan a los humanos (Poeggeler 2006). La biosíntesis de la melanina involucra la participación de enzimas lacasas y sintasas de policétidos (Langfelder et al. 2003). En *A. nidulans* la actividad de lacasa se localiza en los cleistotecios jóvenes y en las células Hülle, y una mutante estéril muestra baja actividad de lacasa (Kurtz and Champe 1981).

II. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos utilizan diferentes estrategias para regular el balance entre el crecimiento y la diferenciación celular. La diferenciación asexual y sexual en el hongo *A. nidulans* implica la producción secuencial de diferentes tipos celulares.

Mediante el análisis genético y molecular de mutantes afectadas en etapas específicas de la esporulación asexual (conidiación), se ha logrado identificar algunos de los genes reguladores del desarrollo que actúan río arriba del gen *brlA* (genes *fluG* y *flbA-E*), el cual funciona como regulador central de este proceso. Dichos genes se requieren para una expresión adecuada de *brlA* y las mutantes carentes de estos genes muestran un desarrollo asexual retrasado (colonias con apariencia algodonosa) y una expresión de *brlA* reducida. Sin embargo, la función exacta de algunos de estos reguladores aún se desconoce.

Para contribuir al entendimiento del proceso de la diferenciación asexual en *A. nidulans* se propuso caracterizar la naturaleza del gen *fluF*, cuya mutación también produce un fenotipo *fluffy* o algodonoso y un retraso en la diferenciación asexual, y determinar su función.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar el gen *fluF* y determinar su función en la diferenciación asexual y sexual en el hongo *Aspergillus nidulans*.

3.2. Objetivos Particulares

1. Identificar el gen *fluF* mediante técnicas de genética clásica y molecular.
2. Generar alelos mutantes de *fluF* (*flbD*) que produzcan proteínas afectadas en su función y etiquetadas con la proteína fluorescente mRFP, y cuya expresión este controlada desde el promotor *fluF* o el promotor inducible *alcA(p)*.
3. Estudiar los efectos de los diversos alelos mutantes sobre el desarrollo asexual y sexual.
4. Aislar genes supresores del fenotipo causado por la mutación *fluF1* (*flbD^{R47P}*).

IV. RESULTADOS

4.1. Asignación de la mutación *fluF1* a un cromosoma y mapeo genético.

La mutación *fluF1* se localizó en el cromosoma VIII de *A. nidulans* y se reportó un ligamiento con el gen *choC3* a 4 centimorgans (cM) (Tamame et al. 1988). Sin embargo, los experimentos de mapeo genético que realizó el Dr. C. Scazzocchio (Université Paris-Sud) indicaron que no hay tal ligamiento. Estos experimentos los realizó el Dr. Scazzocchio tanto con una cepa que tiene el marcador *choC3* (ANID_1376), usado originalmente para mapear el gen *fluF*, como con una cepa que tiene el marcador *sonA1* (ANID_1379), que se encuentra a 1 cM de *choC3*. Estos datos hicieron necesario que se verificara su localización. Para ésto se generó un diploide entre la cepa maestra MSF (*yA2 adE20 suA (adE20); AcrA1; galA1; pyroA4; facA303; sB3; nicB8; riboB2*), la cual tiene marcadores genéticos en cada uno de los 8 cromosomas de *A. nidulans* y la mutante *fluF1* (*yA2, adF17, pabaA1; fluF1*).

Los diploides obtenidos, con morfología silvestre, se haploidizan con p-fluorofenilalanina (75 µg/ml), observándose la formación de sectores *fluffies* en las colonias debido a la segregación de los cromosomas al azar durante la haploidización. Se procedió a aislar distintos sectores con morfología *fluffy*, los cuales se replicaron para comprobar sus marcadores genéticos. Se esperaba que el gen *fluF1* segregara en repulsión con uno de los 8 marcadores de cada cromosoma. Como se muestra en la Tabla 1, se encontró asociación con todos los marcadores cromosómicos, excepto con el marcador del cromosoma VIII, lo cual indica que la mutación *fluF1* se encuentra en dicho cromosoma, tal como se había reportado (Tamame et al. 1988).

Cromosoma	Marcadores	Proporción (No.) de marcadores cromosómicos en sectores <i>fluffy</i> haploides obtenidos del diploide silvestre MSF/G1059A3	
I	<i>adE20</i>	17	<i>adE20</i>
II	<i>acrA1</i>	19	<i>acrA1</i>
III	<i>galA1</i>	4	<i>galA1</i>
IV	<i>pyroA4</i>	19	<i>pyroA4</i>
V	<i>facA303</i>	24	<i>facA303</i>
VI	<i>sB3</i>	23	<i>sB3</i>
VII	<i>nicB8</i>	18	<i>nicB8</i>
VIII	<i>riboB2</i>	0	<i>riboB2</i>

Tabla 1. La mutación *fluF1* se encuentra en el cromosoma VIII de *A. nidulans*. Se determinó el genotipo de las colonias haploides por pruebas de crecimiento en medios de cultivo designados para rastrear cada marcador en particular.

Una vez confirmado que la mutación *fluF* se encuentra en el cromosoma VIII, se realizó nuevamente el análisis de ligamiento con el gen *sonA*. Las cepas *sonA1* presentan un fenotipo criosensible, lo que facilita la identificación de mutantes sencillas *sonA1* y dobles *sonA1 fluF1*. Nuestros resultados y los datos del Dr. Scazzocchio indican que no hay ligamiento entre los genes *fluF1* y *sonA1* (o el gen *choC3*), como se muestra en la tabla 2, la proporción de los diferentes tipos de progenie es 1:1.

Cruza	Genotipo parental	Genotipo de la progenie			
		No. total de ascosporas	Tipos parentales	Tipos recombinantes	Frecuencia recombinación (%)
SO368 x G1059A3	$\frac{+ sonA1}{fluF1 +}$	186	<i>sonA1 +</i> , <i>+ fluF1</i> (25, 25)	<i>sonA1 fluF1</i> , ++ (21, 28)	<i>sonA1:fluF1</i> (49)

Tabla 2. El gen *fluF1* no está ligado al gen *sonA*. Se aisló un cleistotecio híbrido de la cruce G1059A3 y SO368 y se analizó la segregación de los marcadores de interés en la progenie. Los valores entre paréntesis representan las frecuencia de los genotipos indicados. Los marcadores segregaron en una proporción 1:1. El número total de ascosporas analizadas fue de 186.

4.2. *fluF1* es un nuevo alelo del gen *flbD*.

La mutante algodonosa *fluF1* se aisló mediante mutagénesis química con 5-azacitidina (Tamame et al. 1983). Para tratar de identificar la posición cromosomal del gene involucrado en la función afectada, se realizó un análisis de complementación en diploides usando cepas mutantes en genes que también se localizan en el cromosoma VIII y cuya mutación causa un fenotipo algodonoso, tales como *tmpA* (Soid-Raggi et al. 2006) y *flbD* (Wieser and Adams 1995). Un diploide generado como producto de las cruzas entre las mutantes *fluF1* y *flbD1* mostró fenotipo algodonoso, a diferencia del fenotipo silvestre que mostró un diploide entre la mutante *fluF1* y la cepa silvestre o la mutante $\Delta tmpA$ (no se muestra). Este dato sugiere que *fluF1* es un alelo del gen *flbD* (Figura 8A). Para confirmar este dato, se realizó una cruce genética entre la mutante *fluF1* y la mutante *flbD1* y al analizar la progenie (329 individuos analizados) se observó que todos los recombinantes mostraban conidiación retrasada (Figura. 8B). La baja recombinación entre estos dos marcadores indica que se trata del mismo gen. Se realizó el análisis de la secuencia del locus *flbD* conocido a partir de productos de PCR amplificados utilizando DNA genómico de una cepa *fluF1*. La secuenciación de dos productos de PCR independientes mostró la sustitución del nucleótido G por C en la segunda posición del codón 47 (CGG a CCG). Esta mutación puntual causa un cambio en la secuencia de aminoácidos predicha; el aminoácido R47, altamente conservado, cambia a prolina en la proteína FlbD (Figura 8D y Figura 9). Proponemos que la mutación R47P afectaría las propiedades redox de la cisteína contigua, ya que al disminuir su pKa bajaría su reactividad. Dicha cisteína está muy conservada en varias proteínas Myb (Figura 10), y en proteínas Myb ortólogas requiere estar en forma reducida para que ocurra la unión al DNA *in vitro* (Guehmann et al. 1992; Heine et al. 2004; Myrset et al. 1993).

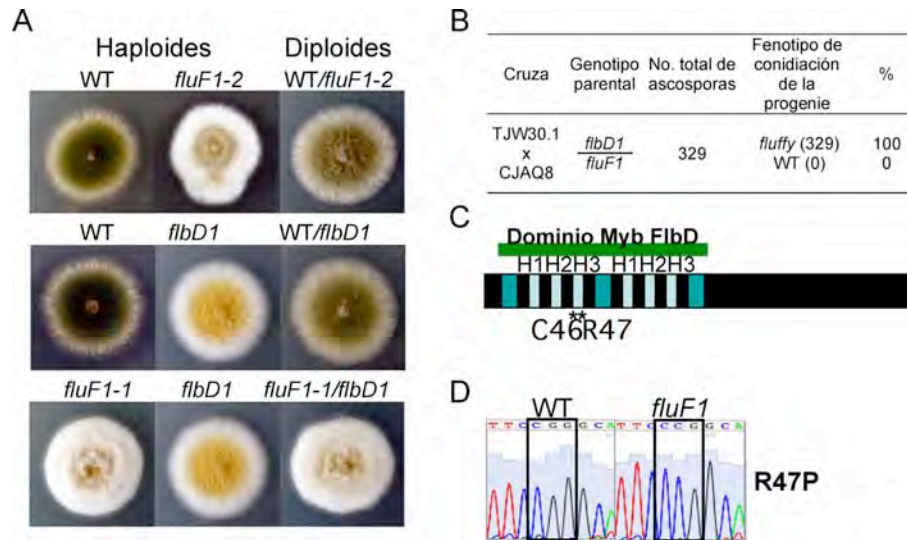


Figura 8. *fluF1* es un alelo del gen *flbD* en el cual el codón de arginina CGG es reemplazado por el codón de prolina CCG. (A) Un diploide entre las mutantes algonosomas *fluF1-1* y *flbD1* muestra fenotipo mutante. Cepas FGSC26 (WT), PW-1 (WT), CAF2 (*fluF1-1*), G1059A3 (*fluF1-2*), TJW30.1 (*flbD1*), CJAQ10 (*fluF1-1/flbD1*), CJAQ18 (WT/*flbD1*) y CJAQ21 (WT/*fluF1-2*) se inocularon en punto en placas de MM suplementado y se incubaron a 37°C por 3 días. (B) Las cepas *fluF1* (CJAQ8) y *flbD1* (TJW30.1) muestran muy baja recombinación en cruzas sexuales. Las ascosporas de un cleistotecio híbrido se inocularon en placas de MM suplementado con extracto de levadura, se incubaron a 37°C por 3 días y se analizó el fenotipo de conidiación. (C) FlbD, es un factor de transcripción de la familia Myb y contiene dos fragmentos repetidos Myb con tres alfa-hélices en cada uno, las cuales se indican como H1-H3. El primer fragmento repetido contiene los aminoácidos altamente conservados cisteína (C46) y arginina (R47). (D) La mutación *fluF1* resulta en el reemplazo de la arginina 47 por prolina (R47P). A partir de DNA genómico de una cepa silvestre (CLK43) y la mutante *fluF1* (G1059A3) se amplificó el ORF de *flbD* por PCR y se secuenció; el ferograma muestra el sitio con la mutación en el alelo *fluF1*. Los genotipos completos de las cepas se muestra en la tabla 3.

El gen *flbD* se identificó previamente y codifica para un polipéptido de 314 aminoácidos, que presenta el 40% de identidad en la parte N-terminal a los factores de transcripción de la familia Myb R2R3. El dominio de unión al DNA de FlbD contiene dos secuencias repetidas con el arreglo estructural clásico de la proteína c-Myb (Figura 9), por lo que se presume que FlbD funciona como activador transcripcional secuencia-específico (Wieser and Adams 1995). En la Figura 8C se muestra una representación esquemática de la estructura de FlbD. El gen *flbD* se caracterizó como miembro de la vía que conduce a la activación del regulador de la conidiación *brlA* (Wieser and Adams 1995). Recientemente, se describió que FlbD se requiere en conjunto con el factor de transcripción bZip FlbB para activar la expresión de *brlA* y la conidiación (Garzia et al. 2010). De acuerdo con estos

datos y nuestros resultados, en este trabajo nos propusimos entender más acerca del mecanismo por el cual FlbD lleva a cabo su función durante el desarrollo asexual y explorar si posee otras funciones en el desarrollo de *A. nidulans*.

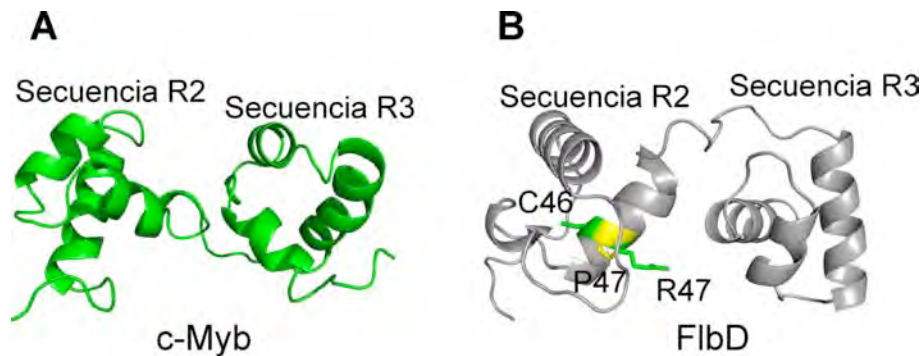


Figura 9. Dominio Myb de la proteína c-Myb y un modelo de la región correspondiente de FlbD. Representación de “Ribbon” del dominio de unión al DNA R2R3 de la proteína Myb FlbD de *A. nidulans* (color gris) (B) basado en el modelo de la proteína c-Myb (color verde) (código PDB 1MSF P06876) (A). Los residuos C46 y R47 corresponden a los aminoácidos conservados en diversos miembros de la familia Myb. Se ha reportado que C46 juega un papel en la regulación redox *in vitro*. El cambio R47P en FlbD resulta en una proteína inactiva, lo cual podría deberse a la consecuente disminución del pKa de la C46 y la disminución de su reactividad. Las proteínas fueron modeladas con el programa PyMOL.

4.3. Diferentes alelos de *flbD* muestran un desarrollo asexual distintivo.

Con el fin de analizar el fenotipo *flbD* nulo en cuanto al desarrollo asexual, se eliminó el gen *flbD* mediante reemplazo por recombinación homóloga usando la construcción 5'*flbD*-Afp_{pyrG}-3'*flbD* (Figura 11A), generada por la técnica *double-joint PCR* (Yu et al. 2004) y usada para transformar conidios electrocompetentes (Sánchez 1996) de la cepa CFL3 de *A. nidulans*. Se obtuvieron 8 transformantes PyrG⁺, todas con morfología algodonosa, las cuales se analizaron por hibridación tipo *Southern*. Como se observa todas las transformantes presentan el patrón mutante $\Delta flbD$ que con la sonda utilizada corresponde a la presencia de una banda de aproximadamente 3.5 Kb (Figura 11B).

<i>FlbD A. nidulans</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	MAPT	4
<i>Rca1 N. crassa</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	MSNMPD	6
<i>Bas1 S. cerevisiae</i>	64	ENGL EDV KTI	Q Q SNHLSKCI	AWDVL A TRFK	HTV R TSK D VR	K R WTG S L D EN		113
<i>C1 Z. mays</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	M	11
<i>Myb N. tabacum</i>	56	-WTE E EDN L L	TE V V K R F K G R	N W KK I A E CM N	G-- R T D V Q CL	H R W Q K V L N PE		103
<i>Myb T. thermophila</i>	78	SD E NN D Q I KT	N A IN S T Q NER	G W N Q K I D E K Q	T G K F T D D E I Q	L L K E S M C K Y A		127
<i>Myb D. discoideum</i>	151	K W T S E D Q I L	I K A V N L H N Q K	N W KK I A E H F P	D-- R T D V Q CH	H R Y Q K V L H P N		198
<i>Myb-C D. melanogaster</i>	86	K R W S K S E D V L	L K Q L V E T H G E	N W E I I G P H F K	D-- R L E Q Q V Q	Q R W A K V L N PE		133
<i>c-myb H. sapiens</i>	42	-W T R E E D E K L	K K L V E Q N G T D	D W K V I A N Y L P	N-- R T D V Q C Q	H R W Q K V L N PE		89
<hr/>								
<i>FlbD A. nidulans</i>	5	H R R G P W V P E E	D Q L L L Q L V R E	Q G P N N N W V R I	S Q H M H Y R-S P	K Q C R E R Y H Q N		53
<i>Rca1 N. crassa</i>	7	Q R R G P W S A G E	D Q R L I K L V K D	L G F G N-W V N V	A R I L G T R-T P	K Q C R E R W H Q N		54
<i>Bas1 S. cerevisiae</i>	114	L K K G K W T Q E E	D E Q L L K A Y E E	H G P H W-- L S I	S M D I P G R-T E	D Q C A K R Y I E V		160
<i>C1 Z. mays</i>	12	V K R G A W T S K E	D D A L A A Y V K A	H G E G K-W R E V	P Q K A G L R R C G	K S C R L R W L N Y		60
<i>Myb N. tabacum</i>	104	L V K G P W S K E E	D D L I V E L V E K	Y G C K K-W S F I	A K S M P G R-I G	K Q C R E R W H N H		151
<i>Myb T. thermophila</i>	128	F E K G L G E S G L	L K L V S E K A T K	E T L G A-W T Q I	A E V L P Y R-S V	Q S C H N F C R R R		175
<i>Myb D. discoideum</i>	199	L V K G A W T K D E	D D K V I E L V K T	Y G P K K-W S D I	A L H L K G R-M G	K Q C R E R W H N H		246
<i>Myb-C D. melanogaster</i>	134	L I K G P W T R D E	D D M V I K L V R N	F G P K K-W T L I	A R Y L N G R-I G	K Q C R E R W H N H		181
<i>c-myb H. sapiens</i>	90	L I K G P W T K E E	D Q R V I E L V Q K	Y G P K R-W S V I	A K H L K G R-I G	K Q C R E R W H N H		137
<hr/>								
<i>FlbD A. nidulans</i>	54	L K P S L N R-- D	P I S A E E G L A I	E R M V N E M G R C	W A E I A R R L G N	R S D N A V K N W W		101
<i>Rca1 N. crassa</i>	55	L K P G L N H-- G	P M T Q E E A A I I	V R E V D L K G P R	W A D I A R K L Q G	R S D N A V K N Y W		102
<i>Bas1 S. cerevisiae</i>	161	L G P G S K G R L R	E W T L E E D L N L	I S K V K A Y G T K	W R K I S S E M E F	R P S L T C R N R W		210
<i>C1 Z. mays</i>	61	L R P N I R R-- G	N I S Y D E E D L I	I R L H R L L G N R	W S L I A G R L P G	R T D N E I K N Y W		108
<i>Myb N. tabacum</i>	152	L D P T I K R-- D	A W T E Q E S V L	C H Y H Q I Y G N K	W A E I A R F L P G	R T D N A I K N H W		199
<i>Myb T. thermophila</i>	176	F N P N Y G -- G	K W T P Q E T S E L	L A L V K E H G R K	W K L I G Q Q L G-	R T E T N V R D K Y		222
<i>Myb D. discoideum</i>	247	L N P N I K K-- E	A W S D E E D Q I I	R D Q H A I H G N K	W A E I A K F L P G	R T D N A I K N H W		294
<i>Myb-C D. melanogaster</i>	182	L N P N I K K-- T	A W T E K E D E I I	Y Q A H L E L G N Q	W A K I A K R L P G	R T D N A I K N H W		229
<i>c-myb H. sapiens</i>	138	L N P E V F K-- T	S W T E E D R I I	Y Q A H K R L G N R	W A E I A K L L P G	R T D N A I K N H W		185
<hr/>								
<i>FlbD A. nidulans</i>	102	NG-----	-----	-----	NM	NRKKRGLQOS	-----	115
<i>Rca1 N. crassa</i>	103	NG-----	-----	-----	LN	NRKKNQLRRQ	SAPRR-----	121
<i>Bas1 S. cerevisiae</i>	211	RK I I T -----	-----	-----	M V V R	G Q A S E V I T K A	I K E N K N I D M T	239
<i>C1 Z. mays</i>	109	NS-----	-----	-----	T L	G R R A G A G A G-	-----	121
<i>Myb N. tabacum</i>	200	N S S V K R L N L	N L P S R L V L D T	E S E G S P N F S S	D K K K I E I K K H	F V Q A Q N A E Q T	-----	249
<i>Myb T. thermophila</i>	223	K S -----	-----	-----	L	G E D N A E Q R K I	E Y W N L D E L I Q	245
<i>Myb D. discoideum</i>	295	NS-----	-----	-----	S M	K R -----	-----	300
<i>Myb-C D. melanogaster</i>	230	NS-----	-----	-----	T M	R R K Y D V E R R S	V N A S G S D L K S	253
<i>c-myb H. sapiens</i>	186	NS-----	-----	-----	T M	R R K V E Q E G Y L	Q E S S K A S Q P A	209

Figura 10. Los aminoácidos C46 y R47 de FlbD están altamente conservados en los dominios Myb de diferentes proteínas presentes en diversos organismos. El dominio Myb de FlbD contiene dos secuencias repetidas (R2R3), indicadas por una línea negra. La primer secuencia repetida (R2) contiene la C46, la cual está involucrada en la regulación redox de otras proteínas Myb *in vitro*. La C46 y la R47, la cual cambia a prolina por la mutación *fluF1*, son residuos conservados dentro del dominio Myb; estos aminoácidos se indican en un recuadro negro.

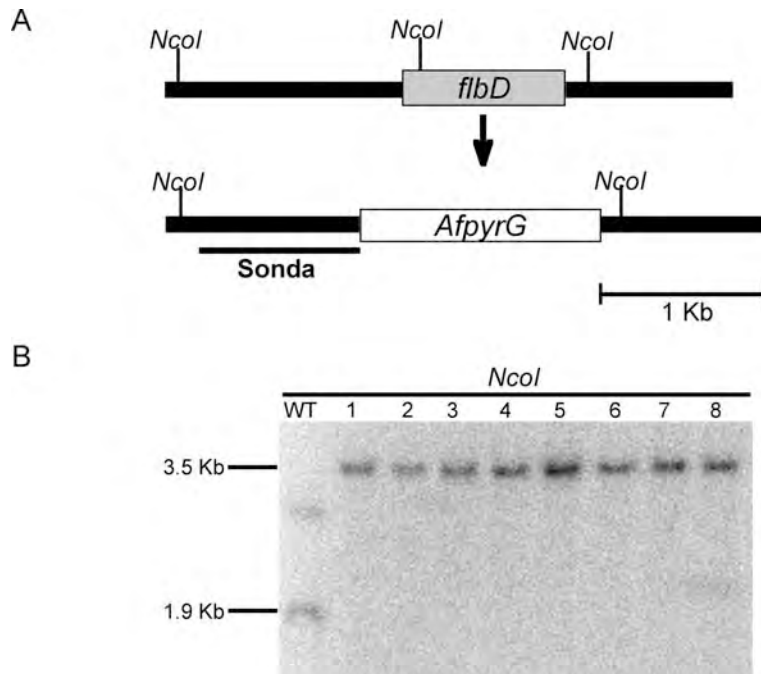


Figura 11. Eliminación del gen *flbD*. (A) La construcción diseñada para la eliminación de *flbD*, basada en el gen *AfpyrG* como marcador selectivo, se generó por *double-joint* PCR (Yu et al. 2004) y se empleó para transformar a la cepa CFL3. El evento de doble recombinación resulta en el reemplazo del locus silvestre *flbD* por el alelo con la eliminación del gen. (B) Hibridación tipo *Southern*. El DNA de la cepa silvestre y de las transformantes PyrG^+ se digirió con *NcoI* y se usó para el análisis con la sonda indicada en (A). El patrón silvestre después de digerir con *NcoI* corresponde a una banda de 1867 pb, mientras que el patrón $\Delta flbD$ corresponde a una banda de 3470 pb.

Al comparar los niveles de conidiación de los diferentes alelos mutantes en el gen *flbD*, se observó que todos ellos muestran un retraso en la esporulación asexual, siendo más severo el defecto de la mutante nula (Figura 12). La mutante *flbD1* la generaron Wieser y Cols (1995), mediante la inserción de un fragmento de DNA de 4.1 Kb, el cual incluye el marcador seleccionable *trpC*. La inserción se llevó acabo 410 pb corriente abajo del sitio del inicio de la transcripción de *flbD*. El análisis del mRNA de *flbD* realizado en la mutante *flbD1* muestra la acumulación de un transcrito de aproximadamente 1 Kb, mientras que en la cepa silvestre es de 1.6 Kb (Wieser and Adams 1995). Por el contrario, en la mutante *flbD^{R47P}* los niveles del mRNA de *flbD* no se alteran (Figura 13). Estos datos sugieren que los alelos *flbD1* y *flbD^{R47P}* producen proteínas FlbD con función parcial en la regulación del desarrollo asexual.

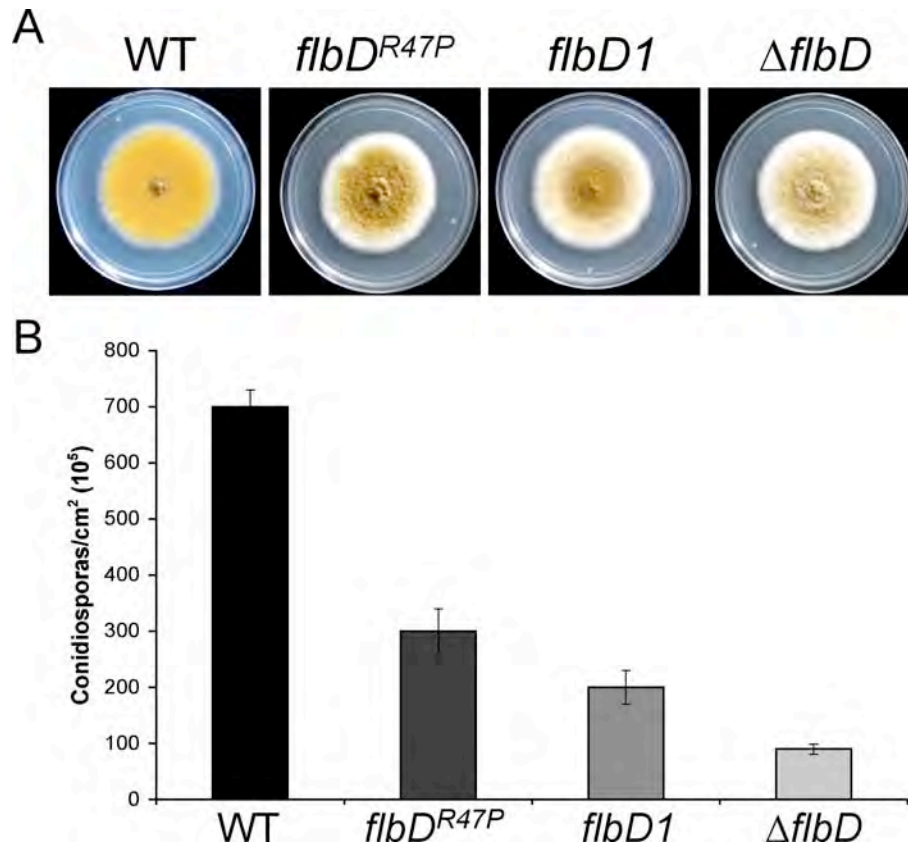


Figura 12. La mutante *flbD*^{R47P} muestra mayor conidiación que las mutantes *flbD1* y $\Delta flbD$. (A) Las cepas CLK43 (WT), CJAQ24 (*fluF1* referida como *flbD*^{R47P}), TJW30.1 (*flbD1*) y TJAQ15 ($\Delta flbD$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado y se incubaron a 37°C durante 5 días. (B) Las conidiosporas totales por colonia se cosecharon, contaron, y la cantidad se dividió por el área de la colonia para obtener el número de conidiosporas por centímetro cuadrado. Las barras de error indican la desviación estándar para tres colonias independientes.

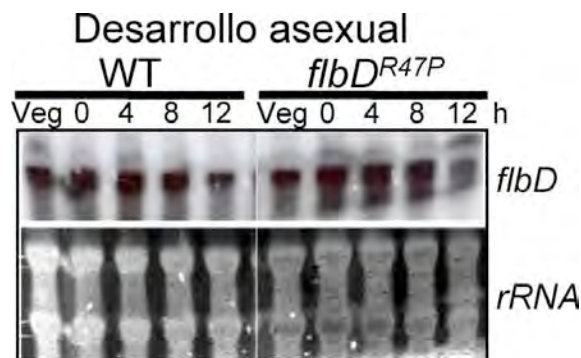


Figura 13. La mutación *flbD*^{R47P} no afecta la expresión del mRNA de *flbD* durante la conidiación. Cultivos líquidos de las cepas CLK43 (WT) y CJAQ24 (*fluF1* referida como *flbD*^{R47P}), se crecieron por 18 h (0 h de conidiación) y se indujeron a conidiar. RNA total de las muestras tomadas a los tiempos indicados se

hibrido con una sonda específica para *flbD*. 0 h de desarrollo (18 h de crecimiento) corresponde a hifas creciendo. El ORF de *flbD* se utilizó como sonda. La tinción de la membrana con azul de metileno se uso como control de carga del RNA total.

La mutante *flbD1* se aisló en un escrutinio para identificar mutantes “fluffy” que mostraban una disminución en la expresión del gen *brlA*, el regulador primario de la conidiación (Wieser et al. 1994). En las cepas mutantes *flbD1* la expresión de *brlA* es menor al 5% con respecto a la cepa silvestre, determinada mediante la expresión del gen reportero *lacZ* dirigida desde el promotor de *brlA* (Wieser et al. 1994). Como se observa en la figura 14, *flbD^{R47P}* afecta la acumulación temporal del transcrito de *brlA*, es decir, en las mutantes *flbD1* (Wieser and Adams 1995) y *flbD^{R47P}* la expresión de *brlA* está retrasada.

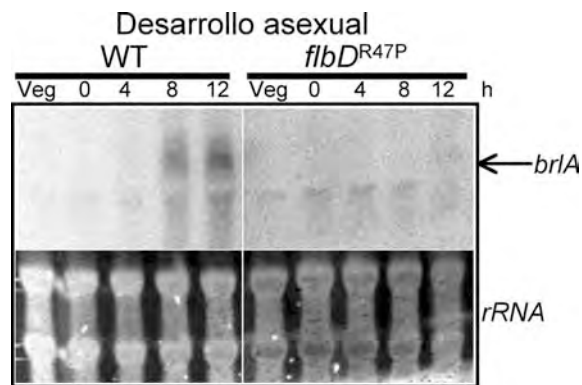


Figura 14. La expresión del mRNA de *brlA* está retrasada en la mutante puntual *flbD^{R47P}*. Cultivos líquidos de las cepas CLK43 (WT) y CJAQ24 (*fluF1*) se crecieron por 18 h (0 h de conidiación) y se indujeron a conidiar. RNA total de las muestras tomadas a los tiempos indicados se hibrido con una sonda específica para *brlA*. 0 h de desarrollo (18 h de crecimiento) corresponde a hifas creciendo. La tinción de la membrana con azul de metileno se uso como control de carga de RNA total.

Se desconocen otros genes blanco de *flbD* durante el desarrollo asexual, además de *brlA*. Con la finalidad de conocer algunos candidatos realizamos un análisis de microarreglos a partir de una muestra de 8h de inducción de la conidiación por exposición a una interfase aérea. Los resultados preliminares de los microarreglos sugieren algunos

genes que participan en la respuesta antioxidante y en el metabolismo secundario por mostrar un valor significativo de sobre-expresión o represión (Tabla S1 y S2).

4.4. El papel de la cisteína C46 del dominio Myb de FlbD en el desarrollo asexual.

Con base en experimentos *in vitro* se ha propuesto que la cisteína altamente conservada en el repetido R2 del dominio Myb de proteínas Myb R1R2R3 y R2R3, presentes en plantas, hongos y animales (Figura 10), puede funcionar como un sensor molecular del estado redox de la célula. La oxidación de la cisteína afecta la afinidad de unión de Myb al DNA (Myrset et al. 1993). Contigua a esta cisteína en las proteínas Myb se encuentra conservado un residuo de arginina. Los aminoácidos básicos contiguos a esta cisteína aumentan la reactividad de la misma y la hacen más accesible a la oxidación (Gabrielsen et al. 1991). En la proteína FlbD estos residuos corresponden a C46 y R47 (Figura 9 y 10). Como hemos indicado antes, la sustitución R47P produce una proteína FlbD con función parcial durante el desarrollo asexual (Figura 12), lo cual podría deberse a una alteración de las propiedades redox de C46. Sin embargo, el papel de C46 en la función de FlbD no se ha determinado. Con el fin de entender dicha función y la regulación de la misma, se generaron alelos mutantes con mutaciones puntuales en los residuos de aminoácido C46 y R47. Se ha propuesto que los cambios C46D y C46S generan proteínas incapaces de unirse al DNA (Buck et al. 2000; Guehmann et al. 1992; Myrset et al. 1993), mientras que el cambio C46A, resulta en una proteína cuya unión a DNA no se altera o incluso se mejora (Myrset et al. 1993). La R47 se reemplazó por un residuo de lisina, esperando que al mantener una carga positiva contigua a la cisteína no se afectara la unión al DNA y por lo tanto la función de FlbD. De hecho, en algunas proteínas Myb de *Entamoeba histolytica* el residuo contiguo a la cisteína corresponde a una lisina (Meneses et al. 2010).

Las mutaciones puntuales antes descritas en el dominio Myb de FlbD se introdujeron por *overlap extension PCR* (Figura 15A) y siguiendo el protocolo de recombinación *in vitro* GATEWAY se generaron plásmidos integrativos pMT-mRFP (Toews et al. 2004). Los alelos mutantes y el alelo silvestre quedaron fusionados al gen de la proteína mRFP y se colocaron bajo el control del promotor *inducible alcA(p)* (Figura 15B). Este promotor se reprime en la presencia de glucosa y se induce por etanol o por treonina y parcialmente durante la conidiación (Marhoul and Adams 1995). Los plásmidos obtenidos se transformaron en un fondo $\Delta flbD$ por fusión de protoplastos, dirigiendo la integración al *locus argB* (Figura 15C). En las transformantes $ArgB^+$ obtenidas se comprobó el evento de integración de los alelos mutantes y silvestre de *flbD*, mediante hibridación tipo *Southern*. Como se observa en la Figura 15C, todas las transformantes presentan el patrón silvestre, que corresponde a las bandas de 1.6 y 2.3 Kb, y una banda de 8.0 Kb que indica la integración en *locus* de *argB*. Algunas de las transformantes contienen más de una copia de *flbD* integrada en *argB* e incluso en otras regiones del genoma. Las mutaciones puntuales se confirmaron mediante secuenciación de productos de PCR obtenidos usando DNA genómico de las transformantes como templado (no se muestra).

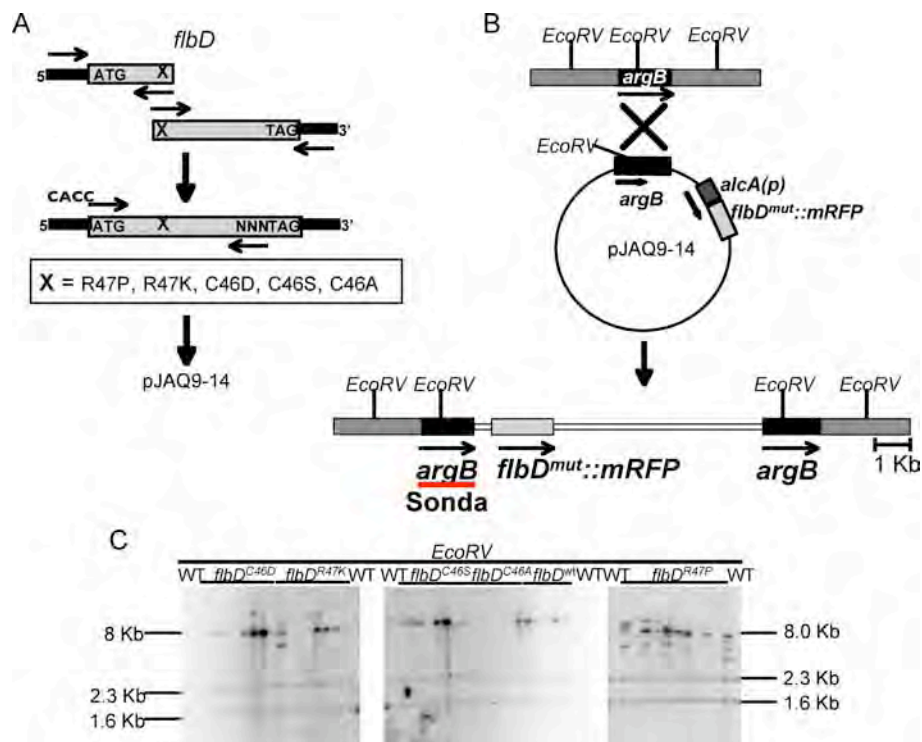


Figura 15. Construcción de los alelos mutantes *flbD*. (A) Mutaciones puntuales en *flbD*, indicadas por una "X" se generaron por PCR, y los productos de PCR se clonaron en un vector pMT-mRFP1 (Toews et al., 2004). (B) Los plásmidos pJAQ9-14 los cuales contienen el alelo silvestre o los alelos mutantes (C46D, C46S, C46A, R47P, R47K) se usaron para transformar la cepa CJAQ25 ($\Delta flbD$). La integración de los plásmidos en el locus *argB* repara el alelo *argB* mutado, y resulta en prototrofia para arginina. (C) Para confirmar la integración de los plásmidos pJAQ9-14, el DNA de la cepa WT y las transformantes ArgB⁺ se digirió con *EcoRV* y se uso para el análisis tipo *Southern* con la sonda indicada en (A) (fragmento *BamHI-SphI* de *argB* (1.6 Kb) obtenido del plásmido pDC1). El patrón silvestre *EcoRV* corresponde a las bandas de 1.6 y 2.3 Kb y una banda adicional de 8.0 Kb para la integración de los plásmidos pJAQ9-14 en *argB*. Cada mutación puntual se confirmó por secuenciación de un producto de PCR amplificado de las transformantes ArgB⁺ correspondientes (no se muestra).

El fenotipo de las transformantes obtenidas se muestra en la Figura 16. El alelo silvestre con la etiqueta mRFP complementa el defecto en la conidiación de la mutante $\Delta flbD$ y la cantidad de esporas es semejante a la producidas por una cepa silvestre (sin *flbD* etiquetado) en medio mínimo, una condición en la que *alcA* se induce aún en presencia de glucosa (Marhoul and Adams 1995). Estos datos indican que la proteína fluorescente no parece interferir con la función de FlbD. Sin embargo, la etiqueta mRFP permitió localizar la fusión FlbD::mRFP mediante microscopía de fluorescencia en condiciones de crecimiento, de diferenciación asexual o sexual, ni en condiciones de inducción con etanol o treonina (no se muestra). En condiciones de sobre-expresión (glucosa 0.1% o treonina 100mM) se observó el mismo grado de conidiación con respecto a la cepa que no sobreexpresa *flbD* (no se muestra). Por su parte, la expresión de los alelos mutantes *flbD*^{R47P} y *flbD*^{C46D} en medio mínimo produjo bajos niveles de conidiación. En contraste, el alelo *flbD*^{R47K} mostró un mayor número de conidias en comparación al alelo *flbD*^{R47P}, aunque no fue igual al de la cepa silvestre. Esto sugiere que la carga positiva en la posición 47 es importante para la función de FlbD, y que la lisina no resultó funcionalmente equivalente a la arginina. El alelo *flbD*^{C46S} mostró un nivel de conidiación similar al de la cepa *flbD*^{R47K}. El alelo *flbD*^{C46A} presentó niveles de conidiación semejantes a los de una cepa silvestre, lo cual es consistente con los resultados previos que indican que el cambio a alanina no afecta e incluso puede mejorar la afinidad de unión al DNA (Myrset et al. 1993). Estos datos indican que la C46 y la R47 juegan un papel central en la función de FlbD durante el desarrollo asexual.

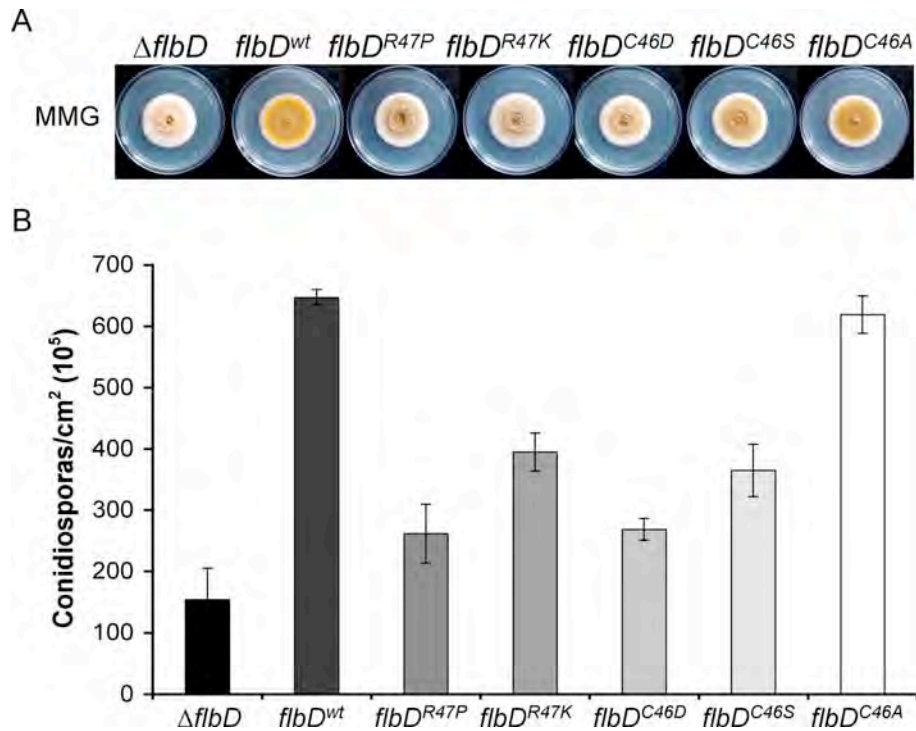


Figura 16. Desarrollo asexual en mutantes $\Delta flbD$ que expresan diferentes alelos mutantes en *trans*, los cuales codifican para proteínas con sustituciones en los aminoácidos C46 y R47. Los plásmidos pJAQ9-14 (dirigidos al locus *argB*) que contienen el alelo *flbD* silvestre o mutante (R47P, R47K, C46D, C46S y C46A) expresados desde el promotor inducible *alcA* y etiquetados con la proteína mRFP en la región C terminal, se usaron para transformar la cepa CJAQ25 ($\Delta flbD$). (A) Las cepas TJAQ15 ($\Delta flbD$), TJAQ20 ($flbD^{wt}$), TJAQ24 ($flbD^{R47P}$), TJAQ30 ($flbD^{R47K}$), TJAQ35 ($flbD^{C46D}$), TJAQ41 ($flbD^{C46S}$) y TJAQ46 ($flbD^{C46A}$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado y se incubaron a 37°C durante 5 días. (B) Las conidiosporas totales por colonia se cosecharon, contaron, y la cantidad se dividió por el área de la colonia para obtener el número de conidiosporas por centímetro cuadrado. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de tres colonias independientes.

4.5. FlbD regula la diferenciación sexual.

El crecimiento de las mutantes $flbD^{R47P}$ (*fluF1*) y *flbD1* de manera individual en medio sólido mostró que éstas producen una gran cantidad de células Hülle. Posteriormente, al realizar diversas cruces con estas cepas y tratar de aislar cleistotecios, se detectó que éstos eran muy suaves y húmedos, lo que dificultaba su aislamiento en forma íntegra. Por ello se decidió investigar el papel de FlbD en la diferenciación sexual,

para lo cual se adaptó un método diseñado para la inducción sexual en *Neurospora crassa* (Bistis 1983; Davis 1970). Como se observa en la Figura 17A, las mutantes en el gen *flbD* son incapaces de producir el tejido externo del cuerpo fructífero denominado peridio, en comparación con una cepa silvestre. Sin embargo, estas mutantes son capaces de formar las esporas sexuales o ascosporas, lo cual está acompañado de la formación de un pigmento rojo o púrpura sobre el agar (Figura 17A), cuya síntesis depende de la fosfopanteteína transferasa CfwA (Figura S1). Dado que estas esporas sexuales rodeadas de células Hülle se encuentran desprovistas del peridio se denominaron ascosporas desnudas. Las ascosporas obtenidas presentaron una viabilidad prácticamente igual a la de una cepa silvestre (no se muestra). El fenotipo sexual de *flbD* es recesivo en diploides como puede observarse en la Figura S2, en un diploide WT//*flbD1*, WT//*flbD^{R47P}* o bien *flbD^{R47P}*// Δ *tmpA* se producen cuerpos fructíferos normales a diferencia de un diploide *flbD^{R47P}*//*flbD1* donde se producen ascosporas desnudas.

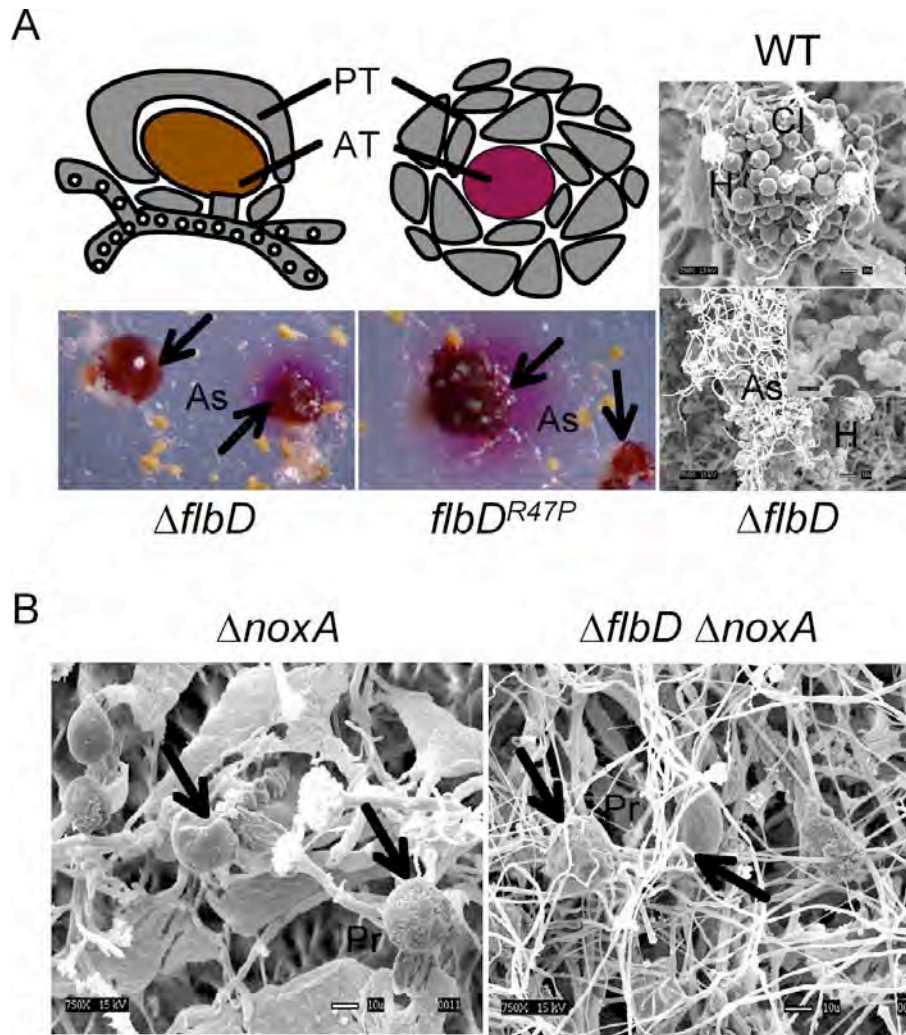


Figura 17. *flbD* se requiere para el desarrollo del peridio pero no para el desarrollo de las ascosporas dependiente de *noxA* durante la diferenciación sexual. (A) Representación esquemática del estado inicial del desarrollo de un cleistotecio (panel superior). Las cepas TJAQ15 ($\Delta flbD$) y CJAQ24 (*fluF1* referida como $flbD^{R47P}$) se crecieron en condiciones de inducción del desarrollo sexual (ver Material y Métodos), y se realizó la observación al microscopio estereoscópico después de 7 días de desarrollo (magnificación 8x) (panel inferior). Las flechas negras indican agregados de ascosporas color rojo carentes del tejido peridial que normalmente las rodea. Se tomaron muestras del cultivo de la cepa silvestre (CLK43) y de la cepa TJAQ15 ($\Delta flbD$) después de 8 días de desarrollo y se procesaron para microscopia electrónica de barrido (panel derecho). Se muestra un cleistotecio silvestre y los agregados de ascosporas de la mutante $\Delta flbD$ junto a algunas hifas. (B) Las cepas CAH4 ($\Delta noxA$) y CJAQ40 ($\Delta flbD \Delta noxA$) se crecieron como se describe arriba. Imágenes de microscopia electrónica de barrido fueron tomadas después de 8 días de desarrollo sexual. PT, tejido peridial; AT, tejido ascógeno; As, ascosporas; Cl, cleistotecio; H, células Hülle; Pr, primordio. Los genotipos completos de las cepas se muestran en la tabla 3

Al analizar los niveles de expresión de *flbD* durante el desarrollo sexual, se observó un incremento ligero en las etapas tempranas del desarrollo (Figura 18). Estos datos

indican que *flbD* además de tener una función en la diferenciación asexual, se requiere para la formación del peridio durante el desarrollo sexual.

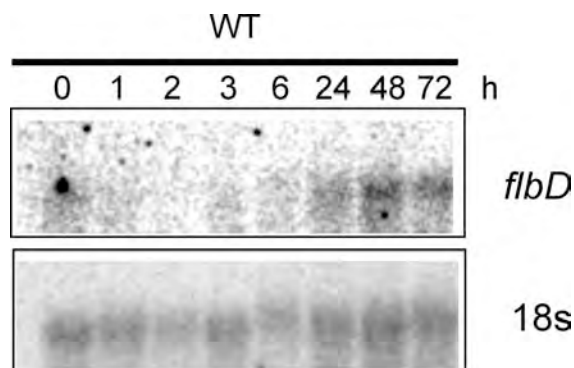


Figura 18. Expresión de *flbD* durante el desarrollo sexual. Cultivos confluentes de la cepa CLK43 (WT) se indujeron a desarrollarse sexualmente. Las muestras de cultivo se colectaron a los tiempos indicados para extraer el RNA total, el cual se usó para análisis tipo *Northern* con una sonda específica para *flbD* (ORF *flbD*). Se indica la posición del transcrito de *flbD* y el *rRNA* 18s, como control de carga de RNA.

Previamente se ha mostrado que la enzima NADPH oxidasa (NoxA) es indispensable para la diferenciación sexual, ya que se requiere para la producción de EROs (Especies Reactivas del Oxígeno) en el tejido peridial y en una mutante en el gen *noxA* sólo se observan primordios de cleistotecios (Lara-Ortiz et al. 2003). De ahí que resulte importante saber si la función de NoxA se requiere para formar ascosporas en las mutantes *flbD*. Como se observa en la Figura 17B, una mutante doble $\Delta flbD \Delta noxA$, al igual que una mutante $\Delta noxA$, está bloqueada en una etapa temprana del inicio del cleistotecio y es incapaz de producir ascosporas. Estos resultados demuestran que la formación del peridio y el desarrollo de las ascosporas son procesos de diferenciación separables para los cuales NoxA es indispensable.

4.6. El gen *flbD* es el único gen *fluffy* que regula el desarrollo sexual.

Existe una gran variedad de mutantes afectadas en el desarrollo asexual que se caracterizan por presentar disminución en la expresión de *brlA* y una conidiación retrasada que resulta en la producción de un fenotipo algodonoso. Entre las mutantes mejor caracterizadas se encuentran las mutantes en los genes *flbB* (Etxebeste et al. 2008), *flbC* (Kwon et al. 2010b), *flbD* (Garzia et al. 2010; Wieser and Adams 1995), *flbE* (Garzia et al. 2009; Kwon et al. 2010) y *tmpA* (Soid-Raggi et al. 2006). Recientemente, se ha demostrado que FlbB y FlbD actúan en conjunto para activar la expresión del gen *brlA* y de esta manera regular la conidiación (Garzia et al. 2010). Por lo tanto, es necesario conocer si la función de FlbD para desarrollar el peridio requiere la participación de FlbB u otro tipo de interacción genética. Como se muestra en la Figura 19, las mutantes en los genes *flbB*, *flbC*, *flbE*, *tmpA* producen cuerpos fructíferos normales, indicando que *flbD* es el único de estos genes *fluffy* que tiene una función en el desarrollo sexual y que ésta es independiente de los genes *flbB*, *flbC*, *flbE*, *tmpA* y *afeA* que sólo parecen requerirse para la reproducción asexual.

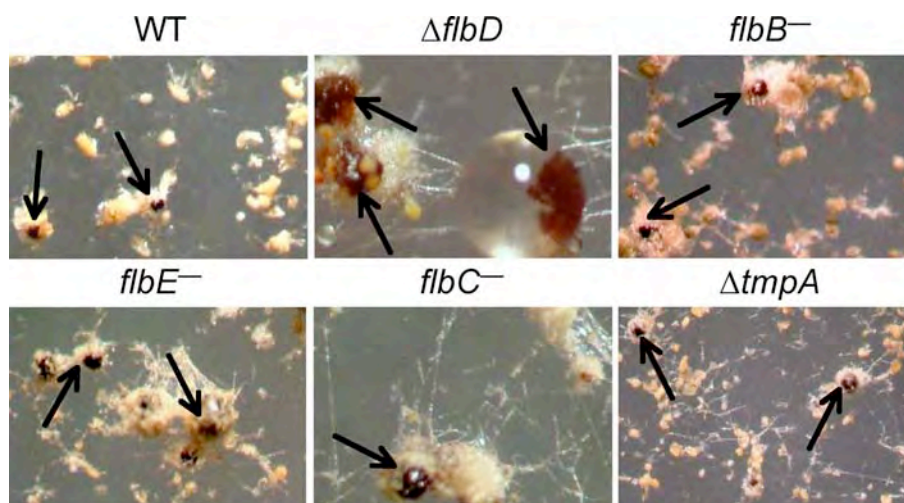


Figura 19. Entre otros genes *fluffy*, sólo *flbD* tiene una función específica en el desarrollo sexual. Las cepas CLK43 (WT), TJAQ15 ($\Delta flbD$), CJA16 (*flbB*), RJF009 (*flbC*), RJW120 (*flbE*) y TGS6 ($\Delta tmpA$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado y se incubaron a 37°C durante 5 días. La inducción del desarrollo sexual se llevó a cabo mediante un método adaptado para *N. crassa* (ver Material y Métodos)

durante 8 días a 37°C. Las imágenes se tomaron con un microscopio estereoscópico con un aumento de 8x. En todas las cepas se observa heterogeneidad en el tamaño de los cuerpos fructíferos. El genotipo completo de las cepas se muestra en la Tabla 3.

4.7. El papel de *flbD* durante el desarrollo sexual es independiente del gen *veA*.

En el laboratorio se trabaja de manera rutinaria con cepas de *A. nidulans* con una mutación puntual en el gen *veA* (*veA1*), que se requiere para la formación del cuerpo fructífero (Kim et al. 2002). El alelo *veA1* causa una mayor producción de conidias y un menor número de cleistotecios (Kafer 1965). Para definir la relación de *veA* con *flbD* en cuanto al desarrollo del peridio, se generaron mutantes $\Delta flbD$ que llevan el alelo silvestre *veA*. El genotipo de la mutante $\Delta flbD veA^+$ se confirmó mediante la amplificación por PCR del alelo silvestre *veA* seguido de una digestión del fragmento amplificado con la enzima *BstXI*, cuyo sitio de corte se ubica en el codón de inicio de la traducción de *veA*, lo cual produce fragmentos de 791 y 270 pb (Figura 20) (Han et al. 2010). En el alelo *veA1* la mutación puntual corresponde a una transversión en el codón de inicio de la traducción (ATG a ATT) (Kim et al. 2002), con lo que se pierde el sitio de restricción para *BstXI*. La disponibilidad del sitio de la enzima permite discriminar el alelo silvestre del alelo mutante *veA1*.

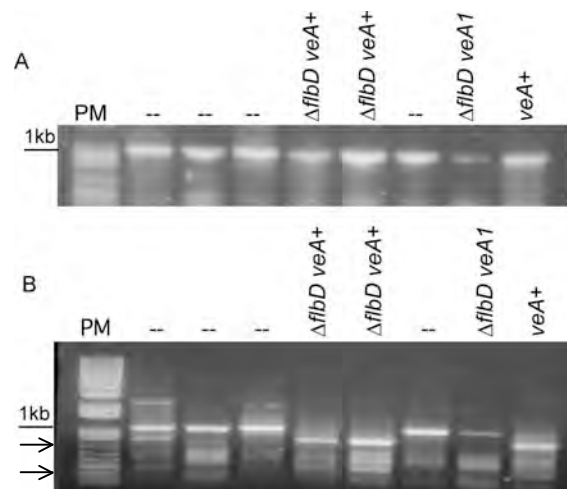


Figura 20. Identificación del alelo *veA*⁺ en cepas $\Delta flbD$. (A) El DNA de la cepa WT (*veA*⁺) y las mutantes $\Delta flbD$ *veA*⁺ se usó para amplificar 1061 pb que corresponden al gen *veA* conteniendo el codón de inicio a la mitad del amplicón. Los oligos empleados se indican en la Tabla 4. (B) El alelo silvestre *veA*⁺ contiene el sitio de restricción para *BstXI* en la región del codón de inicio. El patrón de restricción *BstXI* del alelo silvestre *veA*⁺ corresponde a las bandas de 791 y 270 pb, se indica con las flechas. PM, marcador de peso molecular.

Al inducir el ciclo sexual en la cepa $\Delta flbD$ *veA*⁺, ésta se diferenció produciendo ascosporas carentes de peridio al igual que una cepa $\Delta flbD$ *veA1* (Figura 21), lo que indica que la función de FlbD en el desarrollo del peridio es independiente del gen *veA*.

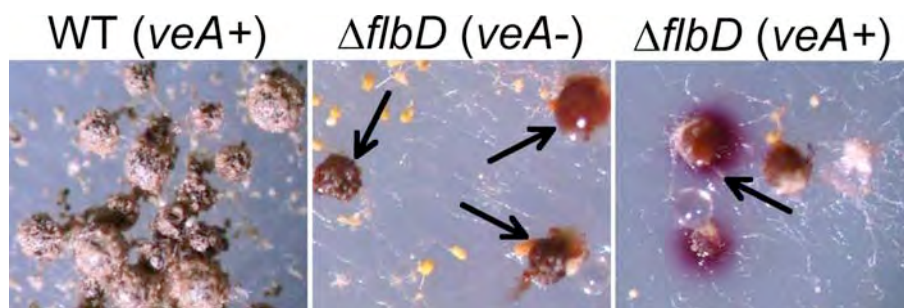


Figura 21. El fenotipo sexual de la mutante $\Delta flbD$ es independiente de *veA*. Las cepas FGSCA4 (*veA*⁺), TJAQ15 ($\Delta flbD$ *veA1*) y COS400 ($\Delta flbD$ *veA*⁺) se inocularon en punto en placas de MM suplementado y se incubaron a 37°C durante 5 días. La inducción del desarrollo sexual se llevó a cabo como ya se indicó. Las imágenes se tomaron con un microscopio estereoscópico con una magnificación 4x. Los genotipos completos de las cepas se indican en la Tabla 3. Las flechas indican los aglomerados de ascosporas desnudas.

4.8. La importancia del residuo de cisteína C46 del dominio Myb de FlbD en el desarrollo sexual.

La funcionalidad de los diferentes alelos *flbD* en el desarrollo sexual se evaluó en un cultivo homogéneo estándar (2% de glucosa), en el cual la conidiación ocurre primero y después sigue la diferenciación sexual. En estas condiciones de cultivo se observó que la expresión del alelo silvestre y del alelo *flbD*^{C46A} desde el promotor *alcA(p)* complementa la función de FlbD en la diferenciación asexual, como se observa por la producción de conidióforos y conidias amarillas (Figura 16), pero no complementan la función de FlbD en

el desarrollo sexual, lo que sugiere que la expresión de *flbD* en *trans* es insuficiente para llevar a cabo el desarrollo sexual y los diferentes alelos de *flbD* producen ascosporas desnudas (Figura 22).

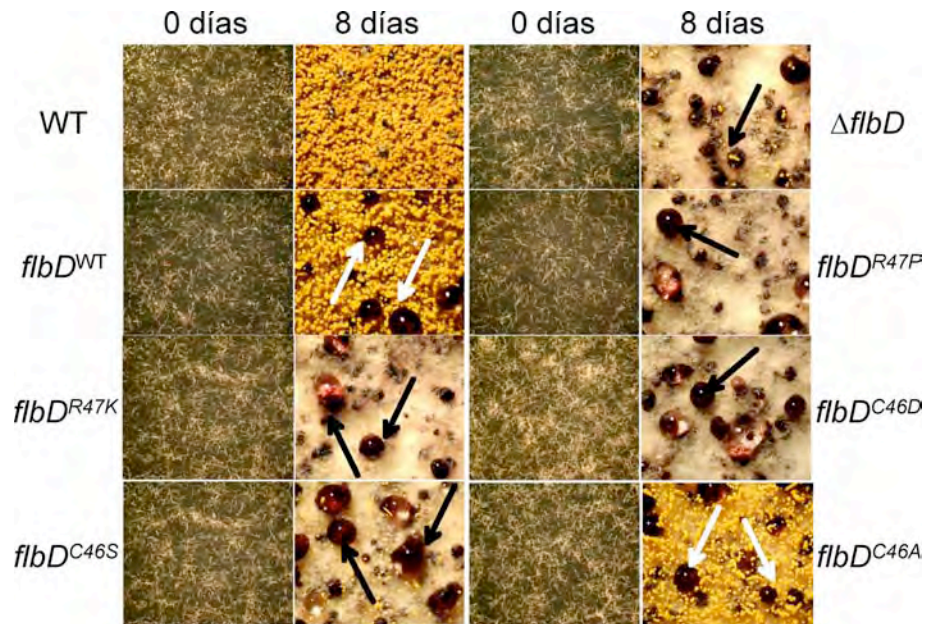


Figura 22. Los alelos silvestre o mutantes no complementan en *trans* la función de FlbD en el desarrollo sexual. Las cepas empleadas en la Figura 15 se inocularon a confluencia usando agar suave y placas de MM suplementado más 2% de glucosa y se incubaron a 37°C por 8 días en condiciones de inducción sexual como describen Lara et al. (2003). Ver la Tabla 3 para los genotipos completos. Observación al microscopio estereoscópico con un aumento de 4x.

Para demostrar el efecto de las mutaciones puntuales en el dominio Myb de FlbD sobre el desarrollo sexual, se generaron nuevas construcciones para poder expresar los alelos silvestre y los mutantes fusionados a la proteína GFP desde el promotor endógeno de *flbD*. Se transformó la cepa A1155 (*nkuA*⁻) con las construcciones y ésta se dirigió al locus de *flbD*. Las diferentes mutaciones puntuales se comprobaron mediante secuenciación del ORF de *flbD* (no se muestra). El fenotipo de conidiación silvestre que mostraron los alelos silvestre y *flbD*^{C46A} (Figura 23), indica que la etiqueta de la proteína fluorescente GFP no interfiere con la función de *flbD* en estas condiciones. No obstante, la localización de FlbD mediante la fluorescencia de la GFP no se pudo observar durante el

crecimiento, el desarrollo asexual o sexual, posiblemente debido a que la proteína FlbD se encuentra en muy bajos niveles *in vivo*. Por su parte, el fenotipo algodonoso de los alelos mutantes *flbD^{C46D}* y *flbD^{R47P}* (Figura 23) confirma los datos obtenidos expresando estos alelos desde el locus *argB* (Figura 16).

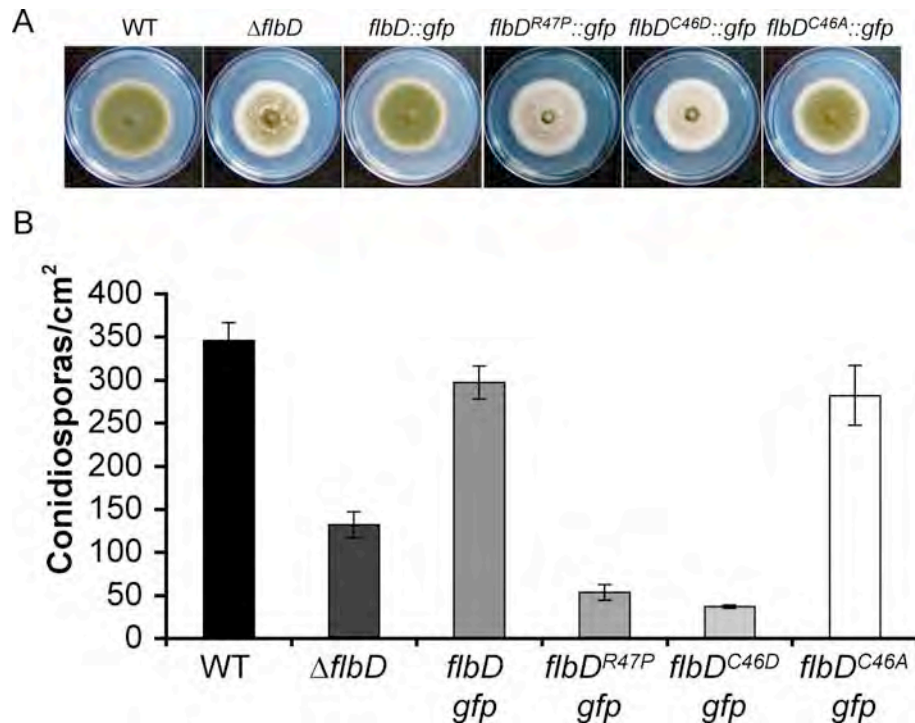


Figura 23. Los aminoácido C46 y R47 en el dominio Myb de FlbD tienen funciones importantes en el desarrollo asexual. (A) Construcciones con el alelo silvestre o mutado (R47P, C46D y C46A) de *flbD*, con el marcador selectivo *pyrG* de *A. fumigatus* y con la etiqueta GFP en C terminal, se usaron para transformar la cepa A1155 (*nkuA*). Las cepas CJAQ51 (WT), CJAQ52 ($\Delta flbD$), TJAQ48 (*flbD::gfp*), TJAQ49 (*flbD^{R47P}::gfp*), TJAQ50 (*flbD^{C46D}::gfp*) y TJAQ51 (*flbD^{C46A}::gfp*) se inocularon en punto en placas de MM suplementado e incubaron a 37°C durante 5 días. (B) Las conidiosporas totales por colonia se cosecharon, contaron, y la cantidad se dividió por el área de la colonia para obtener el número de conidiosporas por centímetro cuadrado. Las barras de error indican la desviación estándar para datos de tres colonias independientes.

Durante el desarrollo sexual, los alelos *flbD^{C46D}::gfp* y *flbD^{R47P}::gfp* no complementaron la función, ya que se observó la producción de ascosporas desprovistas de peridio. Por el contrario, los alelos *flbD::gfp* y *flbD^{C46A}::gfp*, complementaron la función de FlbD en la diferenciación sexual y produjeron cuerpos fructíferos silvestres con ascosporas viables (Figura 24A). Adicionalmente, se observó que la mutante *flbD^{C46A}* produjo una mayor cantidad de cleistotecios en el mismo período de tiempo que una cepa

silvestre (Figura 24B). Estos datos indican que los aminoácidos C46 y R47 tienen un papel esencial en la función de FlbD durante la diferenciación sexual, sin embargo el cambio C46A no afecta tal función.

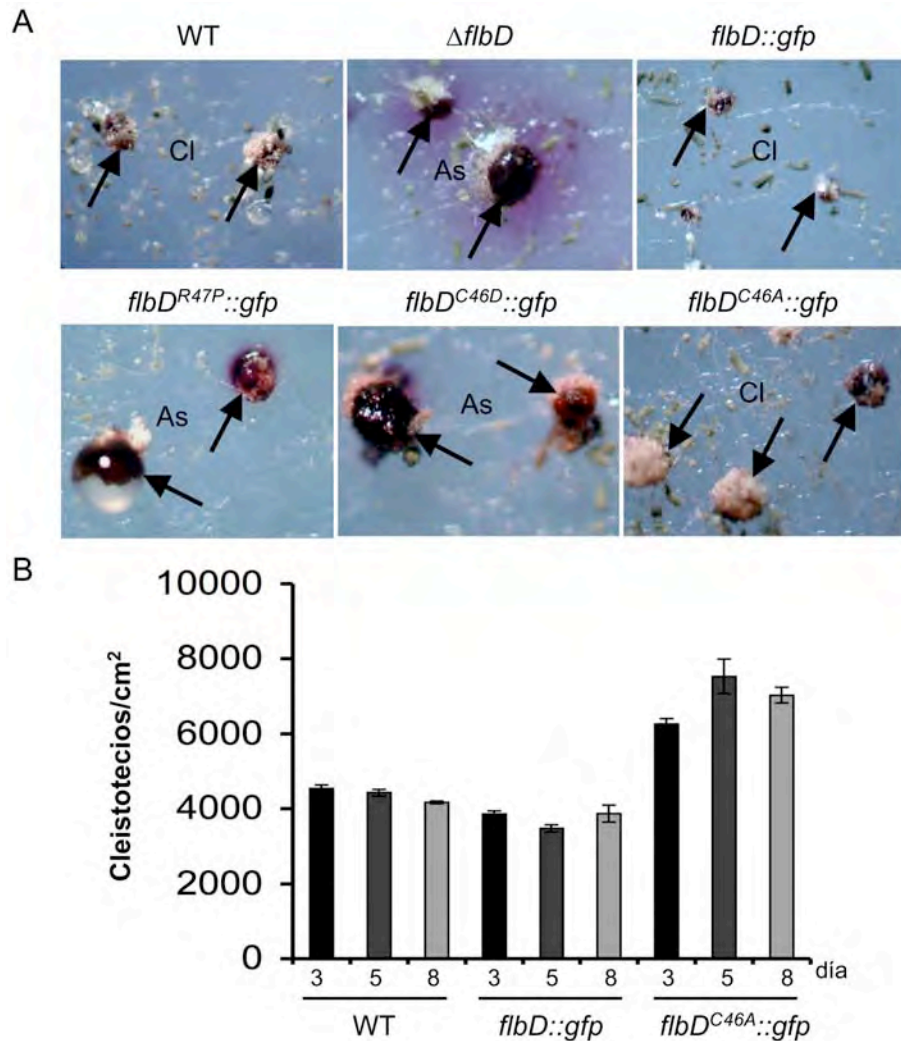


Figura 24. Los aminoácido C46 y R47 en el dominio Myb de FlbD tienen funciones críticas en el desarrollo sexual. (A) Las cepas empleadas en la figura anterior se inocularon en punto en placas de MM suplementado e incubaron a 37°C durante 5 días en condiciones de inducción del desarrollo sexual como ya se ha indicado. Las imágenes se tomaron con un microscopio estereoscópico con una magnificación 8x. (B) Conidias de las cepas CJAQ51 (WT), TJAQ48 (*flbD::gfp*) y TJAQ51 (*flbD^{C46A}::gfp*) se inocularon en agar suave a una densidad de 1×10^5 conidias/placa e incubaron a 37°C. Después de 24 h, las placas se sellaron con masking tape y posteriormente se tomaron muestras a los tiempos indicados. El número de cleistotecios por centímetro cuadrado se calculó como se reportó previamente (Kawasaki et al. 2002). Las barras de error indican la desviación estándar para tres experimentos independientes. En la tabla 3 se indican los genotipos completos de las cepas.

4.9. FlbD regula la conidiación en respuesta a la privación de nitrógeno.

Previamente se ha demostrado que la limitación de nutrientes induce la conidiación de *A. nidulans* en cultivo sólido (Etxebeste et al. 2008) y líquido (Skromne et al. 1995). En cultivo líquido, la privación de carbono induce la diferenciación de conidióforos reducidos (se producen esporas a partir de la punta de la hifa) mientras que en privación de nitrógeno induce la formación de conidióforos completos (con todos los tipos celulares: metúlas, fiálides y esporas) (Skromne et al. 1995). En experimentos de este tipo en nuestro laboratorio se ha visto que las mutantes algodinosas en los genes *tmpA* y *afeA* (Soid 2006; Soid-Raggi et al. 2006), *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (Figura S3, Olivia Sánchez, comunicación personal) muestran conidiación en limitación de carbono pero no en limitación de nitrógeno. Considerando que el alelo *flbD*^{C46A} es funcional en la diferenciación asexual y sexual, se exploró si en condiciones de limitación de nitrógeno es capaz de complementar la función. Como se muestra en la Figura 25, la limitación de nitrógeno induce la formación de conidióforos completos en las cepas silvestre y *flbD::gfp*, mientras que en las cepas $\Delta flbD$ y *flbD*^{C46A} no se producen conidióforos. Estos resultados indican que la mutante *flbD*^{C46A} no puede complementar la función silvestre de FlbD en la conidiación inducida por privación de nitrógeno y que FlbD tiene múltiples funciones en el desarrollo de *A. nidulans*.

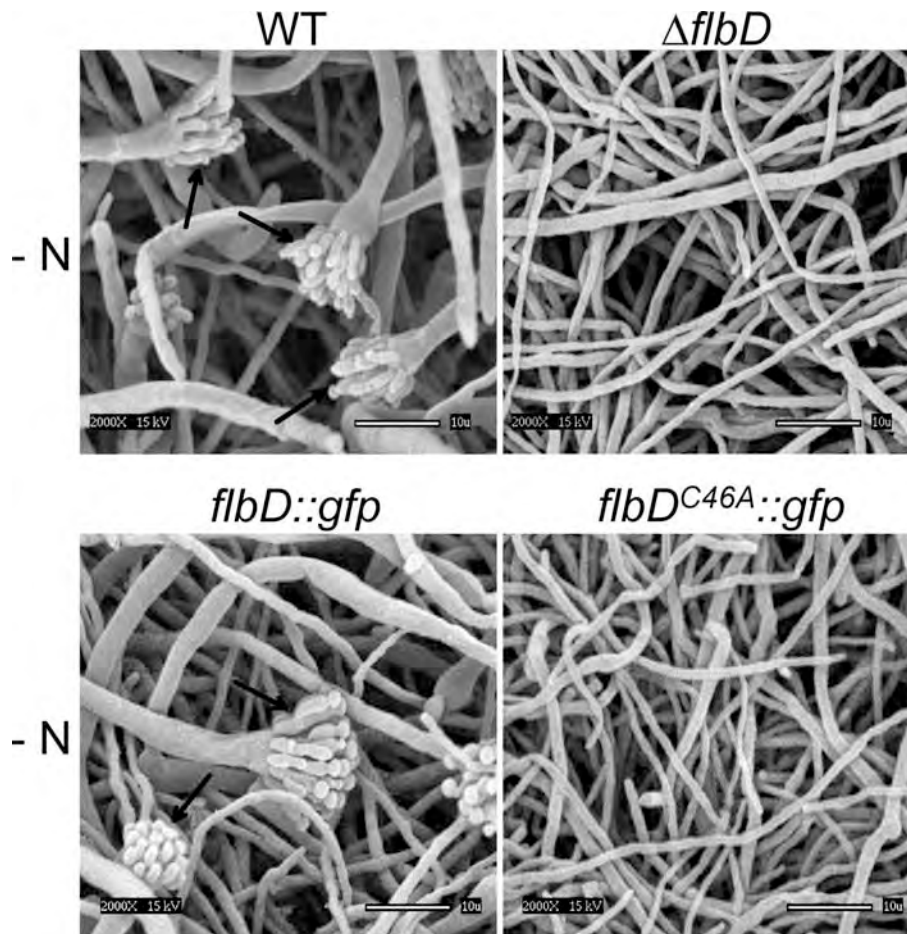


Figura 25. Las cepas *flbD*^{C46A} son incapaces de inducir la conidiación en respuesta a la privación de nitrógeno. El micelio de las cepas CJAQ51 (WT), CJAQ52 ($\Delta flbD$), TJAQ48 (*flbD::gfp*) y TJAQ51 (*flbD*^{C46A} *::gfp*) se creció por 18 h en cultivo líquido y se transfirió al mismo medio pero carente de nitrato (-N). Después de 15 h, las muestras se fijaron y procesaron para microscopía electrónica de barrido.

4.10. Clonación del gen *gal83A* como un supresor en multicopia del fenotipo *fluF1*.

Para conocer la función del gen *fluF* en el desarrollo asexual de *A. nidulans*, en un principio se intentó clonar el gen por complementación empleando una biblioteca genómica del hongo construida en un plásmido de replicación autónoma (pRG3 AMAI NotI) (Osharov and May 2000). Con esta estrategia se obtuvieron 6 transformantes que

presentaban mayor conidiación que la mutante original, siendo esto más evidente en dos de ellas.

A partir de las transformantes con mayor conidiación se lograron recuperar 4 plásmidos (pAV01-pAV04) en *E. coli*, los cuales se analizaron mediante patrones de restricción y se determinó que solamente los plásmidos pAV01 y pAV04 contenían un inserto. Con dichos plásmidos se realizó la re-transformación de la mutante *fluF1* y únicamente con el plásmido pAV04 se obtuvo una mejoría en la conidiación de la mutante *fluF1*, semejante a lo observado previamente (Adriana Valera y Jesús Aguirre, sin publicar). Se analizó la secuencia del plásmido y mediante la comparación con la secuencia genómica de *A. nidulans* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/>), se determinó que el inserto en pAV04 codifica para las proteínas hipotéticas AN6568.3, AN6569.3 y AN6570.3 (Olivia Sánchez y Jesús Aguirre, sin publicar). La proteína AN6568.3 muestra una alta similitud con un dominio tipo SET, presente en las metiltransferasas de lisina específicas de histonas, las cuales están involucradas en la remodelación de la estructura de la cromatina. La proteína AN6569.3 es similar a una endopeptidasa y pertenece a la familia de las metaloproteasas, que participan en numerosas funciones fisiológicas, tales como en la diferenciación celular y en la morfogénesis durante el desarrollo. La proteína AN6570.3 presenta alta similitud con la subunidad β (Gal83) del complejo Snf1 en *S. cerevisiae*, el cual está involucrado en la utilización de fuentes alternativas de carbono (Carlson et al. 1981; Schmidt and McCartney 2000). Posteriormente se co-transformó una mutante *fluF1* con cada uno de esos genes amplificados por PCR y se observó que únicamente las transformantes obtenidas con el gen AN6570.3 mostraban mayor conidiación que la cepa *fluF1* receptora, indicando que el gen AN6570.3 es capaz de suprimir parcialmente el fenotipo *fluffy* de la mutante *fluF1* (no se muestra). Este gen se designó *gal83A* por la alta similitud que la proteína codificada muestra con la subunidad β Gal83 del complejo Snf1 de levadura.

Para evaluar si un número extra de copias del gen *gal83A* podría funcionar como un supresor general del fenotipo *fluffy* causado por mutaciones diferentes de *fluF1*, se realizó la transformación de otras mutantes algodonosas con el plásmido replicativo pJAQ2. La mutante algodonosa $\Delta tmpA$ (*tmpA* codifica para una posible oxidoreductasa) transformada con el plásmido con *gal83A* no mostró una mejoría en la conidiación significativa (Figura 27A y B), mientras que la mutante $\Delta flbC$ (*flbC* codifica para un FT con dedos de zinc) transformada con el plásmido pJAQ2 mostró una moderada mejoría en la conidiación (Figura 28A y B) de acuerdo con el número de copias presente en la transformante (Figura 29). En general, se observó una correlación positiva entre el número de copias del supresor *gal83A* (Figura 29) y el grado de conidiación.

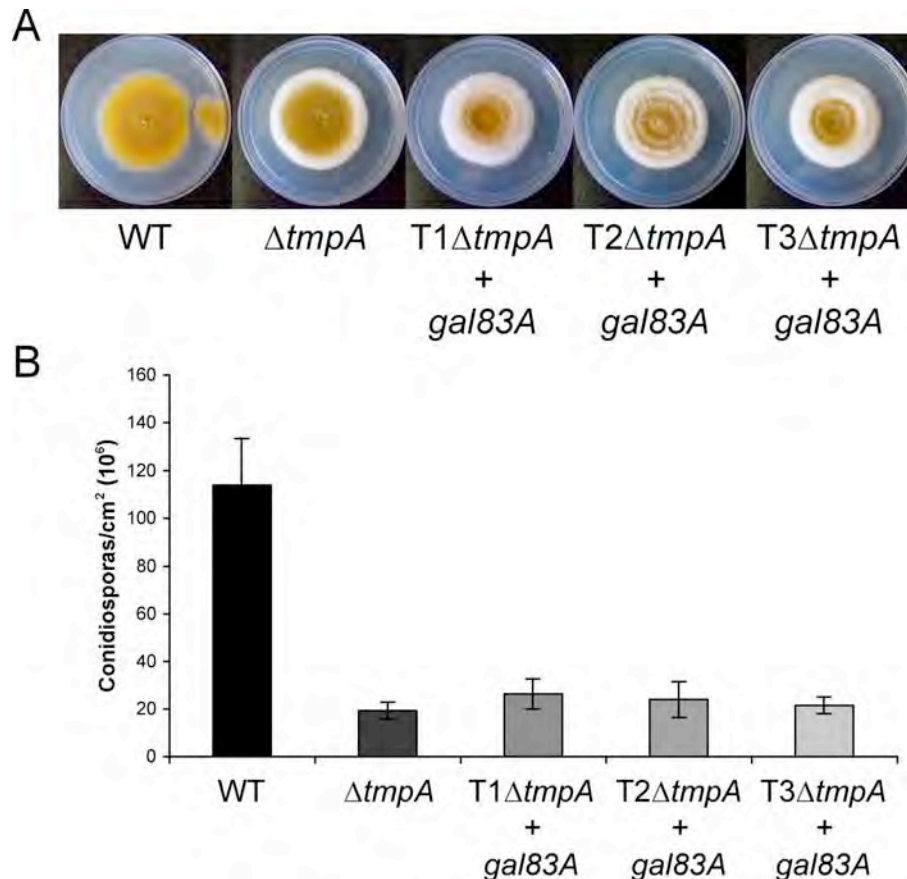


Figura 27. Un número extra de copias del gen *gal83A* no mejora la conidiación de la mutante $\Delta tmpA$. (A) Fenotipo de las transformantes $\Delta tmpA$ obtenidas con el plásmido replicativo pJAQ2 con el gen *gal83A*. Se muestra el crecimiento a 37°C durante 5 días. (B) Cuantificación del número de esporas de las transformantes $\Delta tmpA$ con sobre-expresión de *gal83A* obtenidas con un plásmido replicativo pJAQ2. Los datos se reportan como conidiosporas/cm² y corresponden al promedio del número de esporas obtenido de 3 colonias independientes.

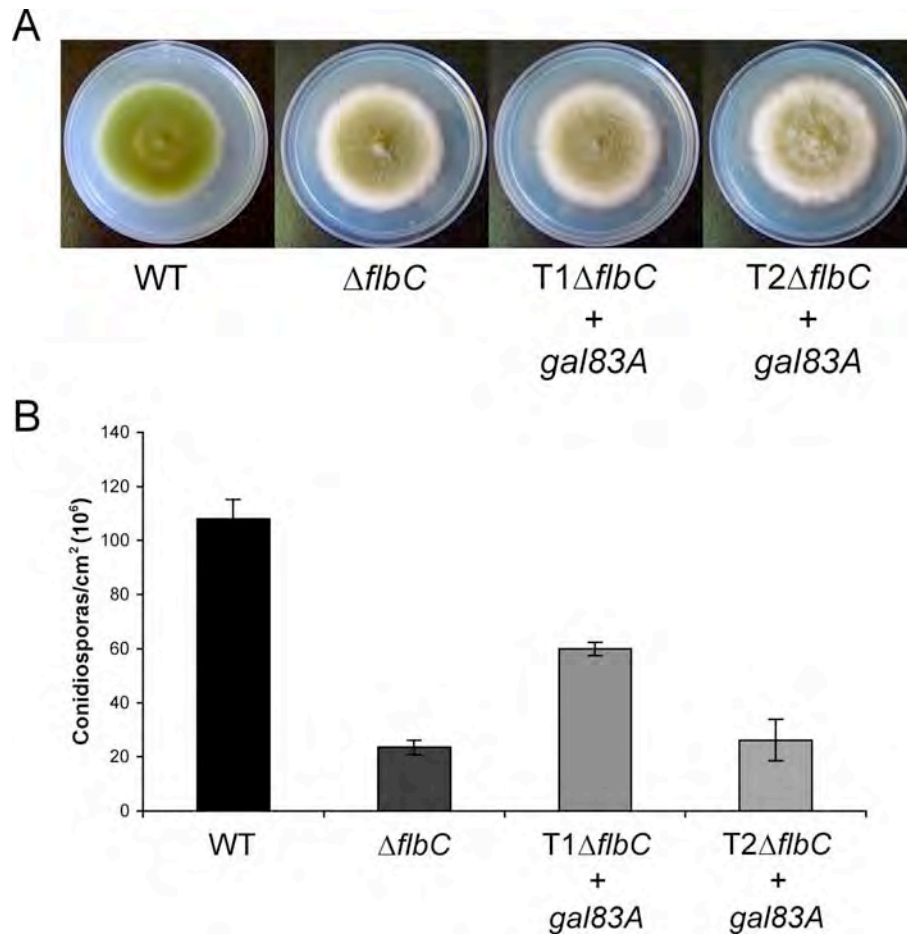


Figura 28. Un número extra de copias del gen *gal83A* mejora ligeramente la conidiación de la mutante $\Delta flbC$. (A) Fenotipo de las transformantes $\Delta flbC$ con sobre-expresión de *gal83A* obtenidas con un plásmido replicativo pJAQ2. Se muestra el crecimiento a 37°C durante 5 días. (B) Cuantificación del número de esporas de las transformantes $\Delta flbC$ con sobre-expresión de *gal83A* obtenidas con el plásmido replicativo pJAQ2. Los datos se reportan como conidiosporas/cm² y corresponden al promedio del número de esporas obtenido de 3 colonias independientes.

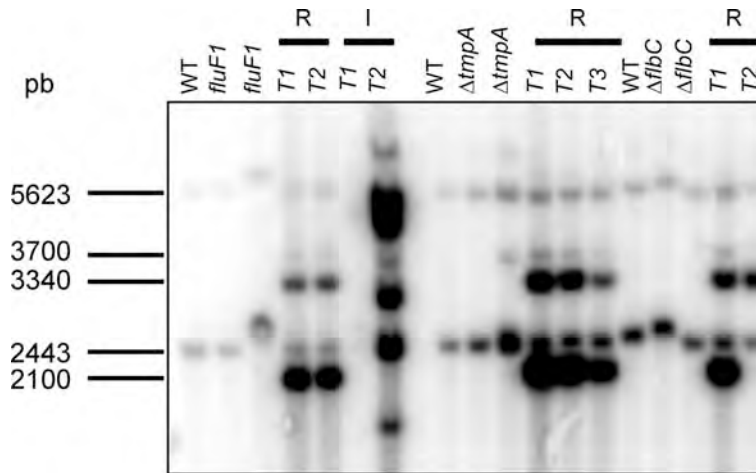


Figura 29. Hibridación tipo Southern de las transformantes *fluF1*, *ΔtmpA* y *ΔflbC* obtenidas con los plásmidos que contienen al gen *gal83A*. La cantidad de copias de *gal83A* correlaciona con una mayor conidiación de las mutantes *fluF1* y *flbC*, no así en la mutante *ΔtmpA*. El ORF de *gal83A* se usó como sonda. El patrón silvestre corresponde a las bandas de 2443 y 5623 pb, mientras que el patrón de las transformantes corresponde a las bandas de 2100, 3340 y 3700 pb. T, transformante; R, plásmido replicativo; I, plásmido integrativo.

Adicionalmente, se observó un aumento en la expresión de *gal83A* en las mutantes *fluffy fluF1* y *ΔflbC* transformadas con el plásmido pJAQ2 (Figura 30), dependiendo de la cantidad de copias del mismo (Figura 29), lo cual correlacionó con un mayor número de esporas en las mutantes (Figura 26 y 28). Por el contrario, en las mutantes *ΔtmpA* con *gal83A* aún cuando presentaron varias copias del supresor y un aumento en la expresión del mismo (Figura 29), no se observó una mejoría en la conidiación (Figura 27).

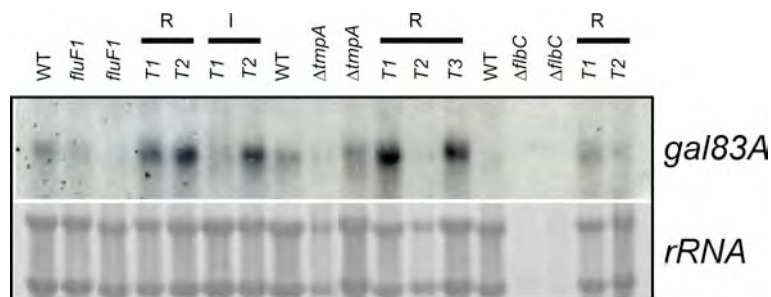


Figura 30. Hibridación tipo Northern de *gal83A* en las transformantes *fluF1*, *ΔtmpA* y *flbC* obtenidas con los plásmidos que contienen al gen *gal83A*. La expresión del mRNA de *gal83A* correlaciona con una mayor conidiación de las mutantes *fluF1* y *ΔflbC*, no así en la mutante *ΔtmpA*. El ORF de *gal83A* se usó como sonda. La tinción de la membrana con azul de metileno se usó como control de carga de RNA total.

En resumen, nuestros resultados muestran que un número extra de copias del gen *gal83A* y la sobre-expresión derivada de ello, suprimen parcialmente, pero de manera específica, el fenotipo de menor conidiación de la mutante *fluF1*.

4.11. Eliminación del gen *gal83A* y caracterización de las mutantes.

El complejo Snf1 pertenece a una subfamilia de cinasas de serina/treonina encontrada en plantas, hongos y mamíferos y juega un papel central en las cascadas de cinasas que funcionan como sensores metabólicos. Los miembros de esta familia son enzimas heterotriméricas compuestas de subunidades α , β y γ . *S. cerevisiae* expresa tres distintas subunidades β codificadas por los genes *SIP1*, *SIP2* y *GAL83* (Figura 31). El complejo Snf1 en presencia de glucosa se encuentra en su forma inactiva, por interacción del dominio regulador con el dominio cinasa de Snf1 (subunidad α) y mantiene al complejo en el citosol; en ausencia de glucosa el mecanismo autoinhibitorio se desbloquea y el dominio regulador de Snf1 interacciona con Snf4 (subunidad γ), el dominio de cinasa de Snf1 se fosforila y activa para continuar la cascada de fosforilación sobre sus proteínas blanco (Figura 31). En *S. cerevisiae* las cinasas que activan a Snf1 independientemente de la subunidad β unida al complejo son Sak1, Tos3 y Elm1 (McCartney et al. 2005). La localización del complejo depende de la subunidad β unida al mismo (Vincent et al. 2001). En levadura, el complejo Snf1 activo permite la utilización de fuentes alternas de carbono al inducir la expresión de genes reprimidos por glucosa, controla la biosíntesis y almacenamiento de glucógeno y juega papeles importantes en procesos de desarrollo tales como la meiosis y la esporulación (Hardie et al. 1998).

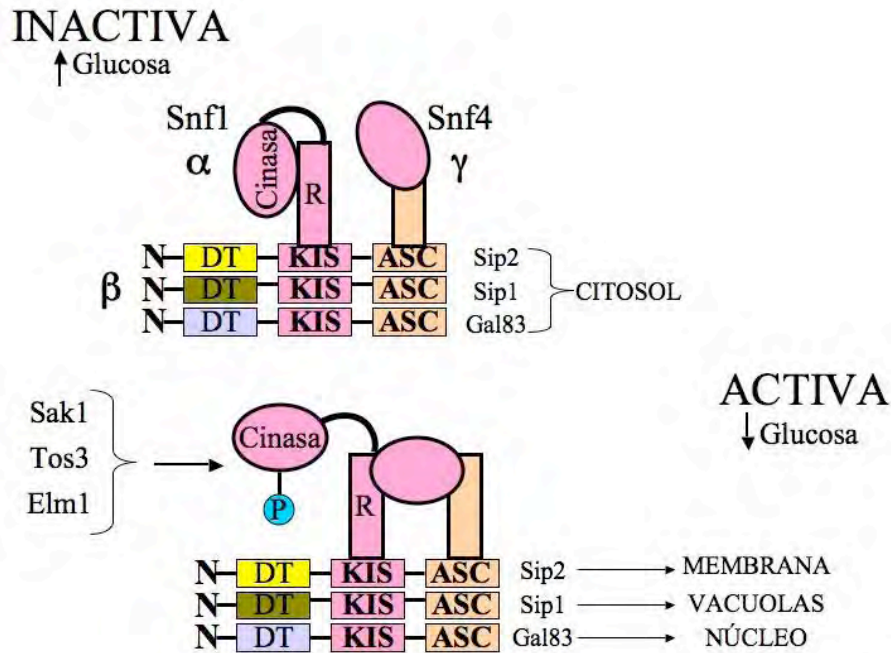


Figura 31. El complejo Snf1 y su función en *S. cerevisiae*. La subunidades β (Sip1, Sip2 o Gal83) actúan como proteínas de anclaje en la interacción de Snf1 y Snf4 en la conformación inactiva y activa. En presencia de glucosa (condiciones de represión, arriba), la cinasa Snf1 se encuentra inactiva por interacción del dominio de cinasa con el dominio regulador de la misma subunidad y el complejo se localiza en el citosol. En ausencia de glucosa (condiciones de desrepresión, abajo) el dominio regulador de Snf1 interacciona con Snf4 y el dominio de cinasa de Snf1 se libera para ser fosforilado por las cinasas (Sak1, Tos3 o Elm1) para activarlo y de este modo fosforilar las proteínas blanco. La localización del complejo depende de la subunidad β unida al mismo. Modificado de (Hardie et al. 1998).

A diferencia de *S. cerevisiae* que cuenta con tres subunidades β cuya función es parcialmente redundante, el genoma de *A. nidulans* predice una sola subunidad β , que formaría parte del complejo Snf1, a la cual hemos denominado Gal83A. Al analizar la expresión del mRNA de *gal83A* se observó que éste se acumula poco en conidias intactas y que sus niveles se incrementan después de la germinación y se mantienen estables durante el crecimiento (Figura 32).

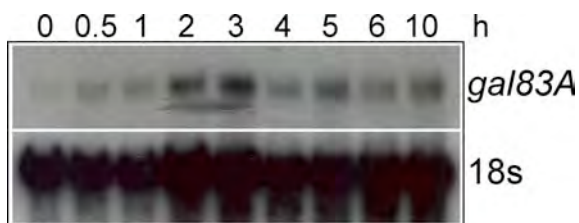


Figura 32. Expresión de *gal83A* durante la germinación y el desarrollo. Cultivos líquidos se inocularon con esporas de la cepa CLK43 (WT) y se incubaron a 37°C con agitación. Se colectaron muestras a los tiempos indicados para extraer RNA total, y este se usó para análisis tipo *Northern* usando una sonda específica para *gal83A*. Se indica la posición del transcrito de *gal83A* y el RNA ribosomal 18S como control de carga.

En *A. nidulans* la esporulación se induce como respuesta diferentes tipos de estrés tales como la carencia de nutrientes (Skromne et al. 1995). En efecto, la conidiación de las mutantes *fluffy* $\Delta fluG$, $\Delta tmpA$, $\Delta afeA$ y $\Delta flbA-E$ mejora notablemente en condiciones de baja glucosa (Soid 2006). Estos datos aunados a la supresión del fenotipo mutante *fluF1* mediante la sobre-expresión de *gal83A* sugirieron que Gal83A podría jugar algún papel en el desarrollo asexual de *A. nidulans*, a través de percibir los niveles de glucosa u otras señales ambientales, como se ha reportado para el complejo Snf1 en levadura. Por ello, decidimos eliminar el gen *gal83A* mediante la técnica de “double joint” PCR (Yu et al. 2004). Se generó la construcción 5’*gal83A*-*AfpyrG*-3’*gal83A*, la cual se usó para transformar una cepa *kuA*- por fusión de protoplastos (Yelton et al. 1984). Se obtuvieron transformantes *pyrG*+ con la eliminación de *gal83A*, las cuales se analizaron por *Southern* (no se muestra). Posteriormente se realizó una cruce para cambiar el fondo genético de la transformante y proceder a realizar la caracterización de la mutante $\Delta gal83A$. Las mutantes $\Delta gal83A$ no mostraron ningún fenotipo evidente, inclusive cuando se crecieron en fuentes pobres de carbono tales como etanol, treonina, acetato, prolina, acetamida, rafinosa, sacarosa y baja glucosa (no se muestra). Únicamente en glicerol, galactosa y pectina se observó un crecimiento menor en comparación a la cepa silvestre (Figura 33).

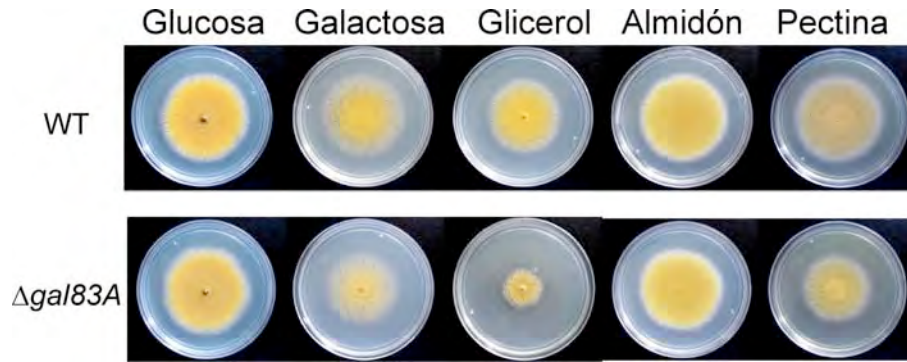


Figura 33. La mutante $\Delta gal83A$ muestra menor crecimiento radial en galactosa, glicerol y pectina. Las cepas CLK43 (WT) y CJAQ29 ($\Delta gal83A$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado con la fuente de carbono indicada al 1% (excepto pectina al 0.5%) y se incubaron a 37°C durante 5 días.

Con el fin de evaluar el papel de Gal83A en la represión por carbono, se analizaron los niveles de expresión del gen *alcA* en una mutante $\Delta gal83A$, ya que éste sería uno de los posibles genes blanco de Gal83A. El gen *alcA* codifica para la enzima alcohol deshidrogenada (ADHI) necesaria para el primer paso del catabolismo del etanol en *A. nidulans*. *alcA* tiene como activador a *alcR* y ambos son reprimidos por el represor global CreA, en presencia de glucosa (Dowzer and Kelly 1989; Mathieu and Felenbok 1994). Sin embargo, se observó que el gen *alcA* presenta el mismo patrón de expresión en la mutante $\Delta gal83A$ y las cepas silvestres, lo que indica que la inducción de *alcA* no requiere de *gal83A* (Figura 34).

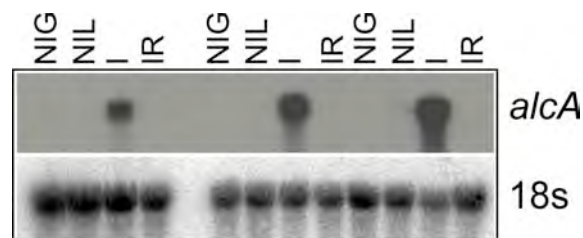


Figura 34. Análisis de la expresión del gen *alcA* en la mutante $\Delta gal83A$. Cultivos líquidos con lactosa 3% y urea 10 mM como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente, se inocularon con esporas de la cepa CLK43 (WT), 11035 (WT *nkuA*-) y 10 $\Delta gal83A$ ($\Delta gal83A$) y se incubaron a 37°C con agitación a 140 rpm durante 16 h. Se realizó la inducción de los cultivos con 2-butanona 50 mM y se colectaron las muestras para extraer el RNA total y se usó para hibridación tipo *Northern* con una sonda específica para *alcA*. Se indica la posición del transcrito de *alcA* y del ribosomal 18S como control de carga de RNA. NIG: no inducido glucosa 1%, NIL: no inducido lactosa 3%, I: inducido 2-butanona 50 mM, IR: inducido-reprimido 2-butanona 50 mM mas glucosa 1%.

Adicionalmente, se buscó si la mutante $\Delta gal83A$ presentaba algún fenotipo al crecer en medios con diferentes fuentes de nitrógeno así como en medios inductores de estrés osmótico, considerando que el complejo Snf1 se ha visto involucrado en respuestas de adaptación en las plantas a diferentes estímulos ambientales además de la fuente de carbono (Baena-Gonzalez and Sheen 2008; Polge and Thomas 2007). En la Figura 35 se muestra que la mutante $\Delta gal83A$ crece ligeramente menos en respuesta a estrés osmótico inducido por NaCl y sorbitol en comparación a la cepa silvestre.

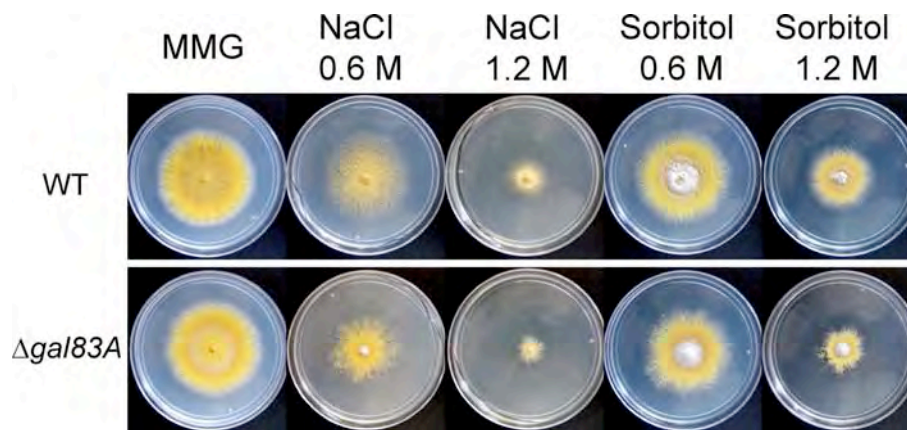


Figura 35. La mutante $\Delta gal83A$ muestra una ligera sensibilidad al estrés osmótico. Las cepas CLK43 (WT) y CJAQ29 ($\Delta gal83A$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado con NaCl o sorbitol a la concentración indicada y se incubaron a 37°C durante 5 días.

Al crecer la mutante $\Delta gal83A$ en diferentes fuentes de nitrógeno se observó una menor densidad en la esporulación con respecto a la cepa silvestre, en presencia de urea y ácido úrico (Figura 36).

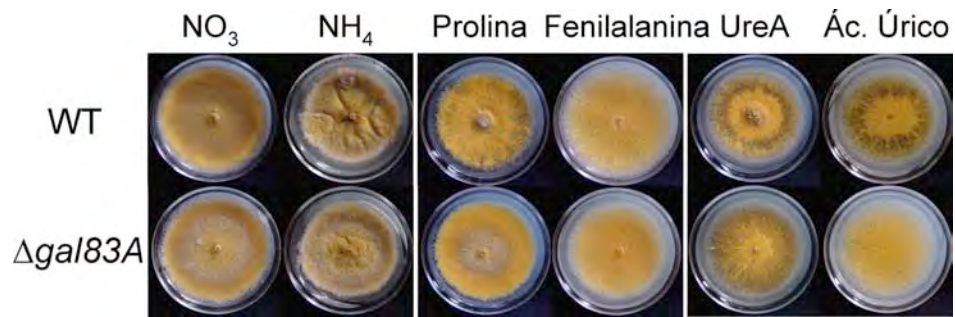


Figura 36. Crecimiento de la mutante $\Delta gal83A$ en diferentes fuentes de nitrógeno. La mutante $\Delta gal83A$ muestra menor conidiación utilizando urea y ácido úrico como fuente de nitrógeno. Las cepas CLK43 (WT) y CJAQ29 ($\Delta gal83A$) se inocularon en punto en placas de MM suplementado empleando diferentes fuentes de nitrógeno a la concentración indicada en material y métodos, y se incubaron a 37°C durante 5 días.

V. DISCUSIÓN

5.1. FlbD se requiere para la formación del peridio de los cuerpos fructíferos.

El análisis genético y bioquímico de diversas mutantes que muestran un fenotipo de conidiación retrasada que se caracteriza por una apariencia algodonosa ha llevado a la identificación de factores que regulan el desarrollo asexual en *A. nidulans*. Este proceso de diferenciación involucra la participación de diversas proteínas activadoras que actúan río arriba de los reguladores de desarrollo centrales, quizás percibiendo estímulos externos para generar la señal de activación de la conidiación (Yu et al. 2006). En este trabajo se caracterizó la mutante algodonosa *fluF1*, la cual pertenece al grupo de mutantes que presentan bajos niveles de expresión del gen *brlA*, el regulador principal de la esporulación asexual. Se demostró que *fluF* es un alelo del gen *flbD*, cuya función conocida es activar al gen *brlA* (Adams et al. 1988). FlbD pertenece a la familia de factores de transcripción tipo Myb R2R3, presente en las plantas, las algas, los hongos y los protozoarios (Dubos et al. 2010). La expresión de *flbD* durante el desarrollo asexual depende del FT bZIP FlbB, y ambos participan en conjunto para activar la expresión de *brlA* (Garzia et al. 2010). Se desconocen otros genes blanco de FlbD aunque nuestros datos preliminares de microarreglos sugieren que algunos podrían ser parte del metabolismo secundario y otros más que regulan la conidiación, así como el balance del estado redox de las células en desarrollo (Tabla S1).

El estudio del proceso de diferenciación sexual en la mutante *flbD* llevó a la identificación de una nueva función; FlbD también es esencial para la formación del peridio, un tejido que constituye la capa externa melanizada de los cuerpos fructíferos que protege las esporas sexuales. La función de FlbD durante el desarrollo sexual es específica, puesto que los genes *flbB*, *flbC*, *flbE*, *tmpA* y *afeA*, cuya mutación también genera un fenotipo *fluffy*, no se requieren para el desarrollo del peridio. Es importante mencionar que aún cuando FlbB regula la expresión de *flbD* durante la conidiación, en el

desarrollo sexual esto no ocurre, y de acuerdo a nuestros datos FlbD no requiere de FlbB para llevar a cabo su función en el desarrollo del peridio.

En el patógeno de plantas *Gibberella zeae* se han encontrado dos genes que codifican para factores de transcripción que contienen un dominio Myb, los cuales están conservados en los ascomicetos, aunque ninguno de ellos es ortólogo de *flbD*. La inactivación de MTY1 resulta en una reducción de la fertilidad femenina, una menor producción de peritecios y, en algunos casos, en la producción de ascosporas inmaduras (Lin et al. 2011). La inactivación de MTY2 resulta en la producción de peritecios de mayor tamaño que contienen más ascosporas maduras, mientras que su sobre-expresión induce la formación de peritecios y ascosporas de menor tamaño y además reduce la producción de conidias, el crecimiento vegetativo, la virulencia y la producción de tricoteceno (Lin et al. 2012). Esto sugiere que diferentes factores de transcripción Myb están involucrados en diferentes aspectos del desarrollo sexual de los hongos. En las plantas, los miembros de la familia de proteínas Myb regulan la biosíntesis de flavonoides, el estado e identidad celular, el ciclo celular, y la respuesta al estrés biótico y abiótico. En estas funciones los factores de transcripción Myb pueden actuar como coactivadores o reguladores positivos, algunas veces llevando a cabo funciones parcialmente redundantes (Dubos et al. 2010; Feller et al. 2011; Lea et al. 2007).

5.2. FlbD^{C46A} una sustitución funcional en la conidiación y en el desarrollo sexual.

Los factores de transcripción Myb se han descrito como blanco de regulación redox a través de la reducción/oxidación de la cisteína 46 conservada en FlbD y en muchos otros miembros de la familia de proteínas R1R2R3 y R2R3 en las plantas, los hongos y los animales. La oxidación de la cisteína afecta la afinidad de unión al DNA *in vitro* (Myrset et al. 1993). Nuestros resultados muestran que en FlbD, las sustituciones C46S y C46D afectan la función durante el desarrollo asexual y sexual. En contraste, la sustitución C46A

resulta en una conidiación silvestre y en la formación de cuerpos fructíferos normales. Es de suponerse que FlbD^{C46A} puede unirse al DNA y regular sus genes blanco de manera constitutiva, ya que el mismo reemplazo en el FT Myb Bas1p de *S. cerevisiae* resultó en un FT funcional *in vitro* e *in vivo* (Pinson et al. 2001). La unión constitutiva al DNA de FlbD^{C46A} parece no interferir con la función normal de FlbD durante la conidiación y podría explicar el incremento en el número de cleistotecios observado en esta mutante.

5.3. FlbD^{C46A} no muestra reproducción asexual en respuesta a la privación de nitrógeno.

El proceso de conidiación se induce además de por contacto con el aire, por estrés nutricional tal como la privación de carbono o de nitrógeno (Skromne et al. 1995; Soid 2006). Hemos encontrado que las mutantes algodonosas afectadas en los genes *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*, *tmpA* (Soid-Raggi et al. 2006) o *afeA* (Soid 2006) son incapaces de inducir el gen *brlA* y la conidiación en condiciones de privación de nitrógeno. Sin embargo, el alelo *flbD^{C46A}*, el cual es funcional en la diferenciación sexual y en la conidiación inducida en una interfase aérea, es incapaz de inducir la conidiación en condiciones de privación de nitrógeno en cultivos sumergidos. En esas condiciones, FlbD podría realizar funciones en la señalización o la utilización del nitrógeno. En *S. pombe*, la proteína de unión al DNA tipo Myb Reb1 regula el arresto en la fase G1 del ciclo celular y la diferenciación sexual en respuesta a la limitación de nitrógeno (Rodriguez-Sanchez et al. 2011), mientras que en el alga roja unicelular *C. merolae* CmMYB1, un FT tipo R2R3 es un regulador principal de la expresión de genes clave para la asimilación de nitrógeno (Imamura et al. 2009).

5.4. Las EROs se requieren para la producción del peridio y de las ascosporas durante el desarrollo sexual.

En *A. nidulans* y en varios hongos se ha destacado que la producción de EROs por la enzima NADPH oxidasa NoxA se requiere para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Aguirre and Lambeth 2010; Cano-Dominguez et al. 2008; Lara-Ortiz et al. 2003; Malagnac et al. 2004). Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta flbD \Delta noxA$ detuvieron su desarrollo en una fase temprana (primordio) de la formación de los cuerpos fructíferos, incluso en la mutante $flbD^{C46A} \Delta noxA$ el desarrollo sexual está bloqueado (Figura S6). Estos datos indican que las EROs se requieren tanto para el desarrollo del peridio como para el de las ascosporas y que esos estados de diferenciación son separables, en donde FlbD participa en la formación del peridio mientras que NoxA participa en ambas etapas. Aunque los niveles de mRNA de *flbD* son bajos durante el desarrollo sexual, se observa un incremento ligero en los niveles de mensajero en el tiempo que corresponde a la producción de los cleistotecios. Este dato y el hecho de que la expresión de *flbD* dirigida desde *alcA(p)* fue suficiente para llevar a cabo la conidiación normal pero no para el desarrollo del peridio, sugiere que para la diferenciación del peridio se requieren niveles altos y/o muy localizados del mRNA de *flbD*. Es necesario realizar más trabajo para determinar si las EROs generadas por la enzima NoxA de manera localizada pueden regular el estado redox de FlbD durante el desarrollo sexual.

5.5. La sobre-expresión de *gal83A* suprime parcialmente el defecto de conidiación de la mutante *flbD*^{R47P} (*fluF1*).

El gen *gal83A* (ANID_06570.1) ubicado en el cromosoma I de *A. nidulans* se identificó como un supresor del fenotipo algodonoso de la mutante *fluF1*, al intentar clonar el gen *fluF* por complementación con una biblioteca genómica de *A. nidulans*.

La proteína Gal83A tiene un dominio de unión a glucógeno y un dominio de interacción en la región C-terminal que también se encuentra en las subunidades β del complejo cinasa de serina/treonina activada por AMP, AMPK/SNF1/SnRK, presente en los mamíferos, la levadura y las plantas, respectivamente. Este complejo multisustrato consta de las subunidades α , β y γ , se activa por una alta concentración de AMP y tiene un papel clave en la respuesta al estado energético de la célula detectando el nivel de AMP/ATP celular (Hardie et al. 2006). En levadura, el complejo cinasa SNF1, que consiste de Snf1 (subunidad α), Sip1/Sip2/Gal83 (subunidad β), y Snf4 (subunidad γ), se requiere para la adaptación a la limitación de glucosa y para el crecimiento en otras fuentes de carbono, y además está involucrada en la respuesta celular a varias condiciones ambientales de estrés, en procesos de desarrollo tales como la meiosis y la esporulación, el crecimiento filamentoso, el control del envejecimiento y la longevidad (Busti et al. 2010; Ghillebert et al. 2011). Por su parte, dentro del genoma de *A. nidulans* mediante la base de datos *STRING: functional protein association networks* (<http://string-db.org/>) se identificó un gen para cada una de las subunidades que formarían el complejo Snf1, ANID_07695.1 (subunidad α); Gal83A, ANID_06570.1 (subunidad β) y ANID_10854.1 (subunidad γ), como ocurre en los hongos filamentosos *G. zeae*, *M. oryzae* y *U. maydis* (S. H. Lee et al. 2009; Nadal et al. 2010; Yi et al. 2008). Esto sugiere que el complejo SNF1 en los hongos filamentosos es más simple que en la levadura.

El análisis BLAST mostró que Gal83A tiene una similitud del 49% con la subunidad β Gal83 del complejo Snf1 de levadura. En *S. cerevisiae* las tres subunidades β son citoplásmicas en condiciones de alta glucosa, mientras que en condiciones de limitación de glucosa, Gal83 se transloca al núcleo. Por su parte Sip1 se relocaliza a la vacuola y Sip2 permanece citoplásmica (Vincent et al. 2001). Aunque en este trabajo no se monitoreó la localización de Gal83A, se predice mediante el programa PSORT (<http://psort.hgc.jp/>), que esta proteína es núcleo-citoplásmica. En *G. zeae* se ha visto que la localización de Snf1 depende del estado de desarrollo del hongo y no de la fuente de carbono (S. H. Lee et al. 2009).

En los hongos filamentosos se ha estudiado poco la función de la subunidad β del complejo cinasa SNF1. Sin embargo, se ha evaluado el papel de Snf1 (subunidad α) y se ha encontrado que la vía de Snf1 está involucrada en el control de la expresión de genes de degradación de la pared celular, los cuales son reprimidos por glucosa y cuya disminución en su expresión resulta en una reducción de la virulencia y de otros eventos de desarrollo en los hongos (S. H. Lee et al. 2009; Ospina-Giraldo et al. 2003; Tonukari et al. 2000; Yi et al. 2008). En *G. zae* la eliminación del homólogo de la subunidad β de *S. cerevisiae* no resultó en un cambio fenotípico detectable, lo que sugiere que la localización de Snf1 es independiente de tal subunidad (S. H. Lee et al. 2009). Asimismo, la cancelación del gen *gal83A* en *A. nidulans* no causó defectos sobre el desarrollo asexual en condiciones de crecimiento estándar. Sin embargo, nuestros experimentos muestran un menor crecimiento radial y una aparente reducción en la producción de conidias en la mutante $\Delta gal83A$ en condiciones de crecimiento con fuentes de carbono alternas tales como el glicerol, la galactosa y la pectina. Una disminución en el crecimiento en medio con galactosa también se ha observado para la mutante $\Delta gzsfn1$ en *G. zae* (S. H. Lee et al. 2009), mientras que en *M. oryzae* la mutante $\Delta mosnf1$ no mostró una reducción de crecimiento significativa en otras fuentes de carbono comparado con el medio suplementado con glucosa, lo que indica que Snf1 es dispensable en la represión por glucosa (Yi et al. 2008). Tanto en *M. oryzae* como en *G. zae* la mutante en *snf1* produce menos conidias y con forma anormal. Además, estas conidias germinan de manera retrasada (S. H. Lee et al. 2009; Yi et al. 2008). En los hongos multicelulares el mecanismo involucrado en la represión catabólica del carbono ocurre por una proteína dedos de zinc, CreA/Cre1 (Dowzer and Kelly 1989; Strauss et al. 1995), la cual es homóloga a la proteína Mig1 de levadura. Contrario a lo que ocurre en levadura, en los hongos filamentosos como se demostró para *Hypocrea jecorina*, la cinasa Snf1 no está involucrada en la fosforilación de Cre1 (Cziferszky et al. 2003), aunque este resultado no descarta la participación de Snf1 en la utilización de otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa. Asimismo, en *A. nidulans* y *Ustilago maydis* se ha reportado que la proteína Snf1 no es clave en la represión catabólica del carbono (Roy et al. 2008) Estos datos concuerdan con

nuestra observación de que en una mutante $\Delta gal83A$ no se afecta la expresión del gen *alcA*, el cual se reprime por CreA en presencia de glucosa (Dowzer and Kelly 1989; Mathieu and Felenbok 1994).

En *A. nidulans gal83A* se expresa durante la germinación y el crecimiento a niveles constantes. Mientras que la sobre-expresión de *gal83A* mejoró la producción de conidias de las mutantes algodonosas *fluF1* y *ΔflbC*, aún cuando crecen en medio suplementado con glucosa al 1%. Nuestros datos sugieren que Gal83A tiene una función en la regulación del crecimiento en diferentes fuentes de carbono y en el desarrollo asexual de *A. nidulans*. Es posible que durante la diferenciación asexual *gal83A* regule genes específicos de la conidiación, como se especula para *snf1* en *M. oryzae*, el cual se expresa a altos niveles durante la conidiación (Yi et al. 2008).

5.6. Gal83A está involucrada en la respuesta al estrés osmótico y al estrés nutricional inducido por nitrógeno.

El complejo AMPK se activa por la limitación de glucosa, el estrés oxidativo y osmótico, el estrés por calor, la hipoxia y la isquemia (Ghillebert et al. 2011; Hong and Carlson 2007). Por su parte, SNF1 en levadura se activa por la limitación de glucosa y nitrógeno, el estrés osmótico, el estrés oxidativo y por el pH (Hong and Carlson 2007).

En *A. nidulans*, la mutante $\Delta gal83A$ mostró menor crecimiento en presencia de estrés osmótico inducido por NaCl y sorbitol, lo que indica que el complejo cinasa SNF1 responde a ambos, a diferencia de *S. cerevisiae* donde sólo el estrés osmótico por NaCl activa a la cinasa, aunque en este caso Snf1 no muestra localización nuclear (Hong and Carlson 2007). Esto sugiere que Gal83A se requiere para activar un mecanismo de protección contra este tipo de estrés.

Se ha demostrado que la limitación de nitrógeno mejora la fosforilación de SNF1 (Orlova et al. 2006) y que la activación de SNF1 por nitrógeno en diploides conduce a la diferenciación pseudohifal en *S. cerevisiae* (Kuchin et al. 2002). Por su parte, Gal83A también responde a la limitación de nitrógeno, la mutante $\Delta gal83A$ produce aparentemente menos conidias en medio con urea, ácido úrico y prolina, lo cual podría deberse a un transporte y/o metabolismo deficiente de esas fuentes de nitrógeno.

VI. CONCLUSIONES

fluF1 es un nuevo alelo del gen *flbD*, cuya mutación puntual en el codón 47 (CGG a CCG) causa el cambio R47P en la secuencia de aminoácidos de la proteína FlbD.

FlbD tiene una función durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos, se requiere para la formación del peridio pero no para la formación de las ascosporas, lo cual depende de la NADPH oxidasa NoxA.

La función de FlbD en la formación del peridio es única entre los genes *flbB*, *flbC*, *flbE* y *tmpA*, cuya mutación produce mutantes con fenotipo algodonoso similar al de mutantes en el gen *flbD*.

El factor de transcripción FlbD tiene funciones específicas en la conidiación y en la diferenciación sexual, para lo cual los aminoácidos C46 y R47 son importantes.

FlbD se requiere para inducir la conidiación en respuesta a la privación de nitrógeno y para esta función el aminoácido C46 no puede ser sustituido por alanina.

gal83A es un supresor parcial del fenotipo algodonoso particularmente en la mutante *fluF1* (*flbD^{R47P}*) y este gen juega un papel en la respuesta a la limitación de nitrógeno y al estrés osmótico, a través de un mecanismo que aún se desconoce.

VII. PERSPECTIVAS

Los bajos niveles de la proteína FlbD detectados *in vivo*, aún cuando se expresa el gen *flbD* desde un promotor fuerte e inducible, impiden el uso de estrategias convencionales como la co-inmunoprecipitación para identificar las proteínas con las que interactúa o la inmunoprecipitación de cromatina para identificar los genes blanco de FlbD, para de esta forma continuar con el estudio de esta proteína y sus funciones en la diferenciación sexual y la conidiación inducida por privación de nitrógeno en cultivo líquido. Un enfoque de transcriptómica podría darnos más información sobre las funciones de FlbD, particularmente utilizando el alelo *flbD*^{C46A} en privación de nitrógeno.

La conidiación se induce por limitación de carbono o de nitrógeno en cultivo líquido. La privación de carbono induce la formación de conidióforos reducidos mientras que la carencia de nitrógeno induce el desarrollo de conidióforos complejos y esto depende del regulador primario BrlA. Datos de nuestro laboratorio muestran que las diferentes mutantes algodonosas son incapaces de conidiar en respuesta a la carencia de nitrógeno en cultivo líquido. Por su parte, la mutante *flbD*^{C46A} muestra conidiación en cultivos expuestos a una interfase aérea mientras que es incapaz de conidiar en respuesta a la limitación de nitrógeno. AreA es el regulador maestro de la represión por nitrógeno y se acumula en el núcleo durante la limitación de nitrógeno. Resulta interesante hacerse las siguientes preguntas:

¿El crecimiento y la conidiación (expresión de *brlA*) de la mutante *flbD*^{C46A} en medio sólido se afectan en diferentes fuentes de nitrógeno?

¿FlbD se une al promotor de *brlA* en condiciones de limitación de nitrógeno?

¿FlbD regula la expresión de *areA*?

¿FlbD interacciona con AreA para activar la expresión de genes para la utilización de fuentes de nitrógeno?

Adicionalmente, en las condiciones de inducción del desarrollo sexual con medio SC utilizadas en este trabajo, una mutante $\Delta sakA$ es incapaz de formar cuerpos fructíferos, mientras que una mutante $\Delta flbD\Delta sakA$ se producen cúmulos de ascosporas desnudas (Figura S9). En estas condiciones de desarrollo hay limitación de nitrógeno, datos de nuestro laboratorio muestran que el gen *noxA* se expresa en el altos niveles en privación de nitrógeno. De ahí que sea importante conocer si existe una relación con el regulador maestro de la represión por nitrógeno, AreA, en condiciones de desarrollo sexual.

Dado que en la proteína Bas1 de *S. cerevisiae* el aminoácido contiguo a la cisteína conservada en las proteínas Myb corresponde a un residuo de alanina, resultaría interesante examinar si el cambio del aminoácido correspondiente en el dominio Myb de FlbD, R47A, generará en una proteína funcional.

En este trabajo no pudimos demostrar que la C46 del dominio Myb de FlbD se regula por redox para llevar a cabo la función de la proteína durante el desarrollo asexual y sexual. Sin embargo, algunos datos de nuestro laboratorio sugieren que FlbD es candidato a regulación redox durante el desarrollo asexual (Figuras S10-14). El alelo *flbD*^{C46A} podría ser evaluado en diferentes fondos genéticos que generen una respuesta antioxidante deficiente.

Nuestros datos mostraron que Gal83A tiene un papel en la respuesta a la limitación de nitrógeno como ocurre en las plantas y en *S. cerevisiae*. Con el fin de ampliar estos datos es interesante responder las siguientes preguntas:

Demostrar de forma cuantitativa que la mutante $\Delta gal83$ produce menor número de esporas asexuales en las fuentes de nitrógeno urea, ácido úrico y prolina.

¿El crecimiento en medio líquido con diferentes fuentes de nitrógeno se afecta en la mutante $\Delta gal83$?

¿En la mutante $\Delta gal8A$ se afecta la expresión de los genes necesarios para el transporte y utilización de fuentes de nitrógeno tales como la urea, el ácido úrico y la prolina?

¿El gen *gal83A* se expresa durante la conidiación?

¿La mutante $\Delta gal83A$ muestra desarrollo sexual silvestre?

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

8.1.1. *Aspergillus nidulans*

Las cepas se crecieron en medio mínimo (MM) de Käfer (Kafer 1977), con glucosa al 1% y suplementado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Para los medios sólidos se usó agar al 1.25%. Para el crecimiento en diferentes fuentes de carbono se preparó MM pero se sustituyó la glucosa por galactosa, glicerol o almidón al 1%, o bien pectina al 0.5%. Para el crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno se preparó MM sustituyendo los nitratos por urea 5mM, prolina 10 mM, fenilalanina 10 mM, tartrato de amonio 5 mM o ácido úrico 0.1%. Para el crecimiento en condiciones de estrés osmótico se adicionó al MM NaCl o sorbitol a una concentración de 0.6 M y 1.2 M. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Las cepas crecidas en medio sólido se incubaron a 37°C y para el crecimiento en medio líquido se incubaron a 37°C a 300 rpm en matraces de 250 ml con 50 ml de medio.

Para inocular los medios de cultivo líquido y cultivo sexual a confluencia se preparó una suspensión de esporas a partir de medio sólido sembrado a confluencia con esporas e incubado a 37°C durante 5 días. Las esporas se cosecharon agregando una solución de Tween-80 al 0.1% y raspando con un asa en forma triangular, la suspensión de esporas se centrifugó a velocidad media durante 5 minutos en una centrífuga clínica y se lavaron 4 veces con agua estéril. El número de esporas se determinó en una cámara de Neubauer.

Los medios de cultivo sólido se inocularon por punto a partir de una colonia aislada utilizando un palillo de madera.

8.1.2. *Escherichia coli*

Para propagar los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina o kanamicina en *E. coli*, se empleó el medio Luria Bertani con 75 µg/ml de ampicilina o con 50 µg/ml de kanamicina, respectivamente (Sambrook et al., 1989). Las bacterias crecidas en medio sólido se incubaron a 37°C y para el crecimiento en medio líquido se incubaron a 37°C a 300 rpm en tubos de cultivo de 12 ml con 3 a 6 ml de medio durante 12 a 14 horas.

8.2. Análisis genético.

8.2.1. Análisis meiótico

Se utilizaron los procedimientos de genética clásica en los que se efectuaron cruces con diferentes cepas de *A. nidulans* para obtener y analizar la progenie (Pontecorvo et al. 1953). Las cepas se seleccionaron con marcadores genéticos diferentes; como se recomienda preferentemente se utilizó una cepa que produce esporas amarillas (lleva la mutación *γA1*) y otra que produce esporas verdes, ya que ello facilitó la selección de la progenie recombinante.

Se inocularon por picadura las dos cepas de manera contigua en MM con todos los requerimientos de las dos cepas, y se incubaron a 37°C durante 2 a 3 días. Una vez que las cepas han crecido lo suficiente y que sus hifas se han fusionado, se cortaron pequeños trozos de la periferia donde ambos micelios se unen y se transfirieron a medio selectivo (MM), se incubaron a 37°C durante 1 día. Las cajas se sellaron con cinta para reducir la tensión de oxígeno e inducir el desarrollo del ciclo sexual y se incubaron a 37°C durante 3 a 4 días para observar la formación de heterocariones (hifas con núcleos diferentes). Las esporas de la zona del heterocarión se rasparon guardándose como una suspensión en aproximadamente 10 ml de agua estéril. Para la obtención de diploides en cajas Petri se colocaron 100 µl de la suspensión de esporas de la zona del heterocarión perfectamente

homogeneizadas y se dispersaron en la caja utilizando la técnica de vaciado en placa, empleando para esto MM. Una vez solidificado el agar se incubaron a 37°C por 2 a 4 días hasta detectar la formación de diploides, los cuales se distinguieron por crecer como colonias circulares y vigorosas de color verde (color de esporas silvestre), a diferencia de los heterocariones que crecieron de forma irregular y con esporas tanto verdes como amarillas. Una vez seleccionado los diploides, éstos fueron estriados para colonia aislada en MM. El diploide crecido bajo estas condiciones puede ser utilizado para análisis posteriores.

Una vez inducido el ciclo sexual se incubaron las cajas durante al menos 6 días para realizar la selección de cleistotecios híbridos. Para realizar el análisis de la progenie obtenida se plaqueó una dilución 1:5 de la suspensión de ascosporas sobre MM con todos los requerimientos de los progenitores y se incubaron a 37°C durante 3 días. Dentro de la progenie se observó la presencia de colonias de ambos colores de los progenitores, tal segregación debe corresponder al 50% de la progenie total de cada color. Se plaquearon varias cajas con las ascosporas para así obtener un número de colonias representativo y realizar el análisis genético.

8.2.2. Mapeo genético

Para mapear una mutación es necesario obtener diploides entre una cepa maestra, la cual lleva marcadores genéticos en cada uno de los ocho cromosomas de *A. nidulans* y la cepa cuya mutación se quiere asignar a un cromosoma.

Para realizar el mapeo se aprovechó de una parte del ciclo de vida de *A. nidulans*, que es el ciclo parasexual. En dicho ciclo se forman diploides estables y posteriormente se haploidiza con una droga; los haploides generados portan cromosomas que segregaron al azar sin haberse dado recombinación mitótica. Posteriormente se realiza el análisis de los haploides en medios selectivos para cada uno de los marcadores de la cepa maestra y se

trata de encontrar una relación entre la segregación de la mutación recesiva de interés y alguno de los marcadores de la cepa maestra. Si uno de los haploides porta el marcador de uno de los cromosomas de la cepa maestra y continúa presentando la característica mutante, quiere decir que la mutación de interés no se encuentra en el cromosoma marcado de la cepa maestra que ahora porta el haploide (Ward, 1991).

Una vez generados los diploides entre la cepa maestra y la cepa mutante, éstos se inocularon por picadura en el centro de cajas Petri con MM más los requerimientos de las cepas adicionando al medio de cultivo estéril y tibio, *p*-fluorofenilalanina (Sigma) a una concentración de 75 µg/ml en agua y esterilizada por filtración. Este compuesto inhibe la formación del huso mitótico (McCully and Forbes 1965). Los diploides se incubaron aproximadamente 5 días a 37°C, hasta observar la formación de diferentes sectores haploides. Estos sectores se observan como zonas que crecen vigorosamente debido a la pérdida de cromosomas. Cada uno de ellos se inoculó en cajas con los diferentes marcadores selectivos menos uno a la vez.

8.3. Determinación del número de esporas/cm².

Las cepas a analizar se inocularon por punto en placas de Petri con medio mínimo suplementado de acuerdo a la cepa, las cuales se incubaron a 37°C durante 5 días. Después del período de incubación, se determinó el diámetro de la colonia y se cosecharon las esporas agregando 10 ml de una solución de Tween-80 al 0.1% estéril y raspando con un asa en forma triangular. Se lavó dos veces la placa y la suspensión de esporas se colocó en un tubo falcón de 12 ml. Se concentraron las esporas centrifugando a velocidad media en una centrífuga clínica durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las esporas se resuspendieron en un volumen de agua conocido. Se determinó la cantidad de esporas/ml mediante una cámara de Neubauer y el número de esporas por área se obtuvo dividiendo el número total de esporas por colonia entre el área de la misma.

8.4. Inducción del ciclo sexual.

Para la inducción del ciclo sexual de las diferentes cepas de *A. nidulans* se inocularon por picadura placas de agar al 1.25% mas suplementos sin fuente de carbono y nitrógeno, y se incubaron a 37°C durante 5 días. Al término de este tiempo de incubación se colocaron cilindros de 0.7 cm de diámetro de medio sintético de cruza (SC) para *Neurospora crassa* (Bistis 1983; Davis 1970) al borde de la colonia. Las cajas se sellaron con cinta para inducir el ciclo sexual y se incubaron nuevamente durante 7 a 10 días más a 37°C para realizar la observación macroscópica.

Para inducir la formación de cleistotecios en forma homogénea se realizaron cultivos a confluencia en condiciones limitantes de oxígeno. Se inocularon 1×10^5 esporas en un tubo con 4 ml de medio mínimo suplementado, con glucosa al 2% y agar suave (0.625 g de agar DIFCO/100 ml). El inóculo se mezcló en el vórtex e inmediatamente se vertió en cajas con MM sólido suplementado, con glucosa al 2% y agar DIFCO. Las cajas Petri se dejaron 30 min a temperatura ambiente para que solidificara el agar suave y después se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se sellaron las cajas con cinta y se continuó la incubación a 37°C por 7 a 10 días más para la observación macroscópica.

8.5. Determinación del número de cleistotecios/cm².

La producción de cleistotecios se determinó a partir de cultivos a confluencia en condiciones limitantes de oxígeno, tomando muestras con un sacabocados (0.6 cm de diámetro) a partir de la inducción del ciclo sexual. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a 4°C hasta que se cuantificaron los cleistotecios. Cada bocado se dividió en 4 partes iguales y se contaron los cleistotecios en $\frac{1}{4}$ de cada bocado. Se determinó la cantidad de cleistotecios total del bocado al multiplicar por 4 y el número de cleistos por área se obtuvo dividiendo el número total de cleistos entre el área

del bocado. Se realizaron 3 experimentos independientes y en cada uno se tomaron 2 muestras al azar de diferentes placas para cada cepa.

8.6. Cultivos de limitación de nitrógeno.

Se inocularon cultivos líquidos con una concentración de 5×10^5 esporas/ml, trascurridas 18 h de incubación los cultivos se filtraron por tela Miracloth y se enjuagaron con un volumen de agua estéril y un volumen de medio mínimo sin nitrato a la temperatura de incubación. Posteriormente, se tomaron las pastillas y se inocularon en medio mínimo sin nitrato para continuar su incubación en las mismas condiciones durante 15 horas más. Se tomaron muestras de las pastillas para ser procesadas para microscopía electrónica de barrido.

8.7. Técnicas de biología molecular.

8.7.1. Eliminación de genes

Se utilizó la técnica *double joint* PCR (Yu et al. 2004) y el gen *pyrG* de *A. fumigatus* como marcador de selección. Se transformó *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos (Yelton et al. 1984) o mediante electroporación de conidias electrocompetentes (Sánchez 1996), seleccionando transformantes protótrofos de acuerdo al marcador selectivo utilizado.

8.7.2. Extracción de DNA y RNA

La extracción de DNA genómico de *A. nidulans* se realizó de acuerdo al protocolo de Timberlake (1980). El RNA se obtuvo por el método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los vectores empleados en este trabajo se obtuvieron utilizando el procedimiento de purificación Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit de Bio-Rad y de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

La preparación de células competentes de la cepa *E. coli* XL1-blue o DH5 alfa se hizo de acuerdo con lo sugerido por Inoue (Inoue et al. 1990). La transformación de *E. coli* y las mini-preparaciones de plásmidos por el método de lisis alcalina se llevaron a cabo conforme a los protocolos de Sambrook et al (1989). Las cepas de bacterias que contienen los vectores construidos en este trabajo se almacenaron a -70°C en glicerol al 15%.

8.7.3. Determinación del mRNA de los genes *gal83A*, *alcA*, *flbD* y *brlA*

La cantidad del mRNA de *gal83A* se determinó en cultivos vegetativos, se inocularon 1600 ml de medio líquido con las esporas obtenidas de 5 placas de la cepa CLK43 (WT) crecidas durante 5 días, se homogenizó y se dividió en 8 cultivos de 200 ml cada uno, se incubaron a 37°C 140 rpm. Se colectaron las muestras de biomasa por filtración de los cultivos a los tiempos indicados.

Para determinar la cantidad de mRNA de *alcA* se utilizaron cultivos líquidos suplementados con lactosa 3% y urea 10 mM como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Se inocularon 800 ml de medio líquido con todas las esporas obtenidas de una placa de la cepa de interés crecida durante 5 días, se homogenizó el cultivo y se dividió en cuatro (NIG, NIL, I, IR). Los cultivos se incubaron durante 16-18 h máximo en agitación a 37°C 140 rpm. La inducción de los cultivos se realizó como sigue: adición de glucosa 1% para NIG, 2-butanona 50 mM para I, y 2-butanona 50 mM y glucosa 1% para IR. Se continuó la incubación durante 2 h 30 min a 37°C 140 rpm y posteriormente se filtró el cultivo para obtener la muestra.

Para determinar la cantidad de mRNA de *brlA* se utilizaron cultivos conidiantes. Para estos cultivos se obtuvo una suspensión de esporas como se describió antes. Se inocularon 50 ml de medio líquido con 5×10^5 esporas/ml. Los cultivos se crecieron durante 18 h en agitación a 37°C 300 rpm. Para inducir la conidiación se filtraron los cultivos con ayuda de una bomba de vacío, el micelio se expuso al aire sobre papel filtro Whatman No. 1 de 10 cm de diámetro. Los papeles filtro con el micelio adherido se colocaron sobre refractarios Pyrex con medio sólido más suplementos. Los refractarios se cubrieron con papel aluminio permitiendo que el aire circulara libremente y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Se tomaron muestras de micelio a las 0, 6, 12, 24 horas después de colocar el micelio sobre el papel filtro.

La cantidad de mRNA de *flbD* se determinó en cultivos conidiantes como los antes descritos y en cultivos sexuales. Para estos últimos se realizaron cultivos a confluencia (ver inducción del ciclo sexual) sobre papel celofán (#1650963, BioRad). Se colectaron muestras a las 0, 1, 2, 3, 6, 24, 48, 72 horas después de sellar las placas con cinta para limitar de oxígeno e inducir el ciclo sexual.

Las muestras colectadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento para la obtención de RNA total.

8.7.4. Hibridación tipo *Southern* y *Northern*

Las hibridaciones tipo *Southern* y *Northern* se hicieron siguiendo las técnicas estándar de Sambrook et al. (1989) en condiciones desnaturalizantes alcalinas y con formaldehído, respectivamente. La separación del DNA (previamente restringido con las enzimas apropiadas) y del RNA se realizó en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con soporte de Nylon Hybond-XL o N (Amersham, GE Healthcare). Los ácidos nucleicos se fijaron con luz UV a la membrana y, posteriormente, se hibridó utilizando una sonda específica marcada con ^{32}P mediante el

kit Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System (#RPN1633, GE Healthcare). Las sondas empleadas fueron obtenidas por PCR o bien por restricción de algún plásmido. Las sondas para hibridar el RNA corresponden al ORF del gen de interés.

8.7.5. Construcción de alelos mutantes en el gen *flbD*

La mutación en el codón TGC a GAT, GCT, TCT en la secuencia de *flbD* de *A. nidulans* resulta en el cambio de la cisteína 46 por aspártico, alanina, serina, respectivamente, y la mutación en el codón CGG a AAG resulta en el cambio de la arginina 47 por lisina.

La generación de los distintos alelos mutantes se realizó mediante la técnica de mutagénesis dirigida (*Overlap extension*) en el gen *flbD*, para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos con la mutación deseada justo a la mitad de la secuencia de los oligonucleótidos (Tabla 4). La mutación se logró mediante amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' de la secuencia codificante de manera que dichas secuencias se sobreponen en la región donde se insertó la mutación.

Posteriormente, mediante PCR y utilizando como molde los fragmentos amplificados previamente se obtuvo la secuencia completa del ORF de *flbD* con la mutación deseada, para lo cual se emplearon los oligonucleótidos For flbDpENTER y Rev flbDpENTER s/stop. Esto permitió poner la etiqueta de la proteína fluorescente mRFP. El oligonucleótido For flbDpENTER se diseñó de acuerdo al manual pENTR Directional Topo Cloning de Invitrogen, y contiene la secuencia CACC justo antes del codón de inicio, ATG, de este modo puede ser clonado en el vector de entrada pENTR.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pENTR en reacciones independientes con lo cual se obtuvieron los vectores pJAQ3, pJAQ4, pJAQ5, pJAQ6, pJAQ7, pJAQ8 (Figura S7). Se mandaron a secuenciar los plásmidos para verificar la

presencia de la mutación esperada, así como la ausencia de mutaciones no deseadas a lo largo de secuencia de *flbD*. Posteriormente se realizaron reacciones de recombinación de estos vectores con el plásmido destino pMT-mRFP (Toews et al. 2004). De tales reacciones se obtuvieron los plásmidos pJAQ9, pJAQ10, pJAQ11, pJAQ12, pJAQ13, pJAQ14 (Figura S8), los cuales se purificaron mediante el kit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit de Bio-Rad y se cuantificaron. Se utilizaron 3 µg de plásmido para transformar la cepa CJAQ25 de *A. nidulans*. Las transformantes se analizaron mediante hibridación tipo *Southern*. Las mutaciones esperadas en la transformantes se confirmaron por secuenciación del ORF completo de *flbD*.

8.7.6. Cepas empleadas en este trabajo.

Tabla 3. Cepas empleadas.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	(Kawasaki et al. 2002)
G1059A3	<i>adE17, pabaA1, yA2; fluF1, veA1</i>	M. Tamame (Tamame et al., 1983)
CAF2	<i>yA2; pyrG89; fluF1, veA1</i>	C. Scazzocchio; progenie de G1059A3 x CS2902
RJF009	<i>biA1; metG1; veA1, flbC8</i>	J. Fondon and T. Adams
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; ; veA1</i>	FGSC
TAH1	<i>pyrG89; pyroA4, ΔnkuA::bar; ΔnoxA::AfpyrG; veA1</i>	A. Hernández; A1155 transformada con la construcción noxA-AfpyrG-noxA
CAH4	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; VeA1</i>	A. Hernández; progenie de TJAQ15 x TAH1
CJA16	<i>biA1; metG1; brlA::lacZ, ΔflbB; veA1</i>	Aguirre 1993
CS2902	<i>biA1, pyrG89; pyroA4; riboB2, veA1</i>	C. Scazzocchio
FGSCA4	<i>biA1</i>	FGSC

PW1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	FGSC
CFL3	<i>pabaA1, yA2, pyrG89; veA1</i>	Lara-Rojas et al. 2011
A1155	<i>pyrG89; pyroA4, ΔnkuA::bar; veA1</i>	M. Hynes (Nayak et al 2006)
11035	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2, ΔnkuA::argB, veA1</i>	M. Hynes (Nayak et al 2006)
CGS45	<i>biA1; metG1; brlA::lacZ::argB ΔtmpA::argB, veA1</i>	Soid Raggi 2005
TJW30.1	<i>pabaA1, yA2, flbD::trpC, trpC801, veA1</i>	Wieser 1995
RJW120	<i>yA2; flbE58, metG1, veA1</i>	Wieser 1994
TGS6	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔtmpA::argB, veA1</i>	Soid Raggi, 2005
CJAQ1	<i>veA1</i>	Progenie de CAF2 x FGSC26
CJAQ2	<i>yA2; veA1</i>	Progenie de CAF2 x FGSC26
CJAQ3	<i>yA2; fluF1, veA1</i>	Progenie de CAF2 x FGSC26
CJAQ4	<i>yA2; ΔtmpA, veA1</i>	Progenie de TGS6 x CJAQ14
CJAQ5	<i>yA2, pyrG89; ΔtmpA, veA1</i>	Progenie de TGS6 x CJAQ14
CJAQ6	<i>flbC8; veA1</i>	Progenie de RJF009 x GR5
CJAQ7	<i>pyrG89; flbC8; veA1</i>	Progenie de RJF009 x GR5
CJAQ8	<i>biA1; fluF1, veA1</i>	Progenie de FGS26 x CAF2
CJAQ9	Diploide C	G1059A3/ MSF
CJAQ10	Diploide 1	CAF2/ TJW30.1
CJAQ11	Diploide 1	G1059A3/ CGS45
CJAQ15	Diploide 1	G1059A3/ CGS17
CJAQ18	Diploide 1	FGSC26/ TJW30.1
CJAQ21	Diploide 1	PW-1/ G1059A3
CJAQ24	<i>yA2, pabaA1; fluF1, veA1</i>	Progenie de CAF2 x CLK43
CJAQ25	<i>yA2, pabaA1; argB2; ΔflbD::AfpG, veA1</i>	Progenie de TJAQ15 x PW1
CJAQ29	<i>yA2, pabaA1; Δgal83A, veA1</i>	Progenie CLK43 x TΔsipA
CJAQ30	<i>yA2, pabaA1; ΔnapA::AfpG; fluF1, veA1</i>	Progenie de CFLΔnapA 2D x CAF2
CJAQ32	<i>yA2, pabaA1; ΔsrrA; fluF1, veA1</i>	Progenie de CAF2 x TΔsrrA-pyrG9
CJAQ36	<i>yA2, pabaA1; ΔatfA; fluF1, veA1</i>	Progenie de ΔatfA-02 x CAF2

CJAQ38	<i>yA2, pabaA1; ΔnapA; ΔflbD, veA1</i>	Progenie TJAQ15 x CFLΔnapA 2D
CJAQ40	<i>yA2, pabaA1; ΔnoxA::AfpyrG; ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	Progenie de TJAQ15 x TAH1
CJAQ46	<i>yA2, pabaA1; DAracA^{G18V}::argB; ΔflbD::AfpyrG, veA</i>	Progenie de TJAQ15 x CABracA ^{G18V} ΔnoxA
CJAQ47	<i>yA2, pabaA1; DAracA^{G18V}::argB; ΔnoxA::AfpyrG; ΔflbD::AfpyrG, veA</i>	Progenie de TJAQ15 x CABracA ^{G18V} ΔnoxA
CJAQ48	<i>yA2, pabaA1; ΔsakA; ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	Progenie de TJAQ15 x CAH
CJAQ51	<i>pyroA4; veA1</i>	Progenie de TJAQ15 x GR5
CJAQ52	<i>pyroA4; ΔflbD::AfpyrG; veA1</i>	Progenie de TJAQ15 x GR5
CJAQ	<i>biA1, pyrG89; argB, veA1</i>	Progenie de CAF2 x PW-1
TJAQ1	<i>yA2; pyrG::gal83A; fluF1, veA1</i>	CAF2 transformada con pJAQ1 (pLK26 + gal83A)
TJAQ2	<i>yA2; pyrG::gal83A; fluF1, veA1</i>	CAF2 transformada con pJAQ1 (pLK26 + gal83A)
TJAQ3	<i>yA2; pyrG::gal83A; fluF1, veA1</i>	CAF2 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ4	<i>yA2; pyrG::gal83A; fluF1, veA1</i>	CAF2 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ5	<i>yA2; pyrG::gal83A; ΔtmpA, veA1</i>	CJAQ5 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ6	<i>yA2; pyrG::gal83A; ΔtmpA, veA1</i>	CJAQ5 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ7	<i>yA2; pyrG::gal83A; ΔtmpA, veA1</i>	CJAQ5 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ8	<i>pyrG::gal83A; flbC8, veA1</i>	CJAQ7 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ9	<i>pyrG::gal83A; flbC8, veA1</i>	CJAQ7 transformada con pJAQ2 (pRG3 + gal83A)
TJAQ15	<i>yA2, pabaA1, pyrG89; ΔflbD::AfpyrG; veA1</i>	CFL3 transformada con construcción cancelación flbD

TJAQ20	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{WT}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ9
TJAQ24	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{R47P}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ10
TJAQ30	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{R47K}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ11
TJAQ35	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{C46D}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ12
TJAQ41	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{C46S}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ13
TJAQ46	<i>yA2, pabaA1; alcA(p)::flbD^{C46A}::mRFP::argB;</i> <i>ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	CJAQ25 transformada con pJAQ14
TJAQ48	<i>pyroA4; flbD^{WT}::gfp; veA1</i>	A1155 transformada con construcción alelo silvestre fusionado a GFP
TJAQ49	<i>pyroA4; flbD^{R47P}::gfp; veA1</i>	A1155 transformada con construcción alelo mutante fusionado a GFP
TJAQ50	<i>pyroA4; flbD^{C46D}::gfp; veA1</i>	A1155 transformada con construcción alelo mutante fusionado a GFP
TJAQ51	<i>pyroA4; flbD^{C46A}::gfp; veA1</i>	A1155 transformada con construcción alelo mutante fusionado a GFP
COS400	<i>pabaA1, yA2; ΔflbD::AfpyrG</i>	Progenie de TJAQ15 x A4

8.7.7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados.

Oligo	Secuencia (5' → 3')	Objetivo
ATG GLICOPT	GTT TAG CGG CCG CTT GGA GTT GAC TTT GAC G	Amplifican el ORF de AN6569 (glicoproteasa) + 500 pb río arriba y 200 pb
STOP	GTT TAG CGG CCG CCC TAT TAC GTC TTA TGT C	

GLICOPROT		río abajo, tamaño 1.9 Kb. Contienen el sitio de restricción <i>Not1</i> . Se quería saber si complementaba la función de <i>fluF1</i>
ATG SET	GTT TAG CGG CCG CGC ATA TAC AGT CCA CAT C	Amplifican el ORF de AN6568 (dominio SET) + 500 pb río arriba y 200 pb río abajo, tamaño 2.8 Kb. Contienen el sitio de restricción <i>Not1</i> . Se quería saber si complementaba la función de <i>fluF1</i> .
STOP SET	GTT TAG CGG CCG CAT CAT CAT CAA CAC C	
ATG PROTX	GTT TAG CGG CCG CGT AAT GAA GTA TAA AGC C	Amplifican el ORF de AN6570 (<i>gal83A</i> subunidad del complejo SNF1) + 500 pb río arriba y 200 pb río abajo. Contienen el sitio de restricción <i>Not1</i> , tamaño 3.4 Kb. Se quería saber si complementaba la función de <i>fluF1</i> .
STOP PROTX	GTT TAG CGG CCG CAG ATT AGA CTT ATT CAG C	
5'FOR SIP	TCT TCA AGT ATG TCC TCC	Amplifican 2 Kb río arriba del ORF de <i>gal83A</i> . Se usó en la construcción para eliminar el gen <i>gal83A</i> .
5'REV SIP+TAIL	AAG AGG GTG AAG AGC ATT GTT TGA GGC CTT GGA AGG ATT ATT GCC	
3'FOR SIP+TAIL	ATC ACG CAT CAG TGC CTC CTC TCA GAC ATA CAA CAT CCT GGT CCG	Amplifican 2 Kb río abajo del ORF de <i>gal83A</i> . Se usó en la construcción para eliminar el gen <i>gal83A</i> .
3'REV SIP	TAC AGC ACT CAC ACT ACC	

5' pyrG	GCC TCA AAC AAT GCT CTT CAC C	Amplifican el marcador pyrG de <i>A. fumigatus</i> a partir del plásmido pFNO3.
3' pyrG	GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG C	
5' NESTED	ATA TAA GTA CTT GAC AAT TGG	Amplifican la construcción final para eliminar el gen <i>gal83A</i> , tamaño 6 Kb.
3' NESTED	CTA TCT TAA TGA GTT TTT CCC	
For flbD	TTG AGT GGA ACA GAA TGC	Amplifican el ORF de <i>flbD</i> + 1000 pb río arriba y río abajo 1000 pb. Tamaño 3 Kb. Se usó para secuenciar. Rev flbD lo use como GSP4 en la fusión de <i>flbD</i> con <i>gfp</i>
Rev flbD	TGG TCA CGC TCG ATA AGC	
flbDf1seq	TTC ATC GCT CTC TGA CTC	Se usaron para secuenciar <i>flbD</i> . flbDf1seq lo usé como GSP1 en la fusión de <i>flbD</i> con <i>gfp</i> .
flbDf2seq	CAA ACC GTC ACT AAA CCG	
flbDr1seq	GGA CAA AAC GCT ACA ACC	
Seq flbD	CCA TTT CGT TGA CCA TCC	
<hr/>		
f3 flbD seq	ATC TAC ACA CTT CCT GC	
r3 flbD seq	TCT GTC GTA GGA GAC G	
5FORflbD	TTG AGT GGA ACA GAA TGC	Amplifican 1 Kb río arriba del ORF de <i>flbD</i> . Se usó en la construcción para eliminar el gen <i>flbD</i> , en negrita se indica la cola para <i>pyrG A. fumigatus</i> .
5REV+TAIL flbD	AAG AGG GTG AAG AGC ATT GTT TGA GGC CTG TGT TGG TGA TGG AGG	
3FOR+TAILflbD	ATC ACG CAT CAG TGC CTC CTC TCA GAC ATC ACA CGA CTC TCT TCC	Amplifican 1 Kb río abajo del ORF de <i>flbD</i> . Se usó en la construcción para eliminar el gen <i>flbD</i> , en negrita se indica la cola para <i>pyrG A. fumigatus</i> .
3REVflbD	AAG CAA TCT CAA CGC AGC	

FORnested flbD	CTG GTC TTA CCG CTT CG	Amplifican la construcción final para eliminar el gen <i>flbD</i> , tamaño 4 Kb.
REVnested flbD	CCT ACC TGA GTG CAA GG	
flbD GSP1b	ATG GCT CCA ACA CA	
flbD GSP2	GTT CAA GAG GTT GTC GAG GCC CAT CCG	
flbD GSP3	ACG ATC ACA CGA CTC TCT TCC TCC CG	
		Se usó para obtener alelos mutantes en C46 y R47 bajo su propio promotor y etiquetados con GFP.
		Su par es flbDf1seq y amplifican el ORF de <i>flbD</i> sin STOP y 100 pb de 5' río arriba, se usó en fusión con GFP, tamaño 1.3 Kb.
		Su par es Rev flbD y amplifican la región 3' río abajo del ORF de <i>flbD</i> , se usó en fusión con GFP, tamaño 1 Kb.

flbD GFP1	CGG ATG GGC CTC GAC AAC CTC TTG AAC GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG	Amplifican el cassette GFP-pyrG <i>A. fumigatus</i> a partir del plásmido pFNO3, tamaño 2.6 Kb. En negrita se indica la secuencia complementaria a <i>flbD</i> .
flbD GFP2	CGG GAG GAA GAG AGT CGT GTG ATC GTG TCT GAG AGG AGG CAC TGA TGC	
Mut For flbD	CAT TCT TCA CCT CAA CG	Se usaron para generar las mutaciones puntuales en los residuos C46 y R47 de FlbD. El codón de la mutación se indica en negrita.
Mut Rev flbD	GAA AAG CGA GAG ACT GAG G	
For flbD (C-D)	CAA GCA AGA TCG GGA ACG	
Rev flbD (C-D)	GTT CCC GAT CTT GCT TGG	
For flbD (C-S)	CAA GCA ATC TCG GGA ACG	
Rev flbD (C-S)	GTT CCC GAG ATT GCT TGG	
For flbD (C-A)	CAA GCA AGC TCG GGA ACG	
Rev flbD (C-A)	GTT CCC GAG CTT GCT TGG	

For flbD (R-K)	GCA ATG CAA GGA ACG TTA CC	con el par de oligos For flbD pENTER o GSP1b y Rev flbD pENTER stop, tamaño 1 Kb.
Rev flbD (R-K)	GGT AAC GTT CCT TGC ATT GC	
For flbD pENTER	CAC CAT GGC TCC AAC ACA CC	Se usaron para amplificar los alelos mutantes en <i>flbD</i> para después clonarlos en el vector de entrada del sistema Gateway.
Rev flbD pENTER stop	TCA GTT CAA GAG GTT GTC G	
Rev flbD pENTER s/stop	GTT CAA GAG GTT GTC GAG G	
For flbB	TGA CCC TCC CAC TTT ACC	Amplifican ORF <i>flbB</i> + 200 pb río arriba y río abajo, tamaño 2.6 Kb.
Rev flbB	CAG CAC AGT TGA AGA CCG	
flbB-1	GGT GAG GGT AGA AAG GG	Oligos que se usaron para secuenciar la mutante en <i>flbB</i> de JAL. Se sintetizaron igual a los oligos que usó el Dr. Unai Ugalde.
flbB-2	GAC AGG GTG ATT CCA GC	
flbB-3	GGG TTT TTC TGA CGT CG	

IX. REFERENCIAS

- Aasland, R., Stewart, A. F., and Gibson, T. (1996), 'The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB', *Trends Biochem Sci*, 21 (3), 87-8.
- 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 (3), 353-62.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. H. (1998), 'Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*', *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (1), 35-54.
- Aguirre, J. (1993), 'Spatial and temporal controls of the *Aspergillus* brlA developmental regulatory gene', *Mol Microbiol*, 8 (2), 211-8.
- Aguirre, J. and Lambeth, J. D. (2010), 'Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals', *Free Radic Biol Med*, 49 (9), 1342-53.
- Allen, R. S., et al. (2007), 'Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (41), 16371-6.
- Andrianopoulos, A. and Timberlake, W. E. (1991), 'ATTS, a new and conserved DNA binding domain', *Plant Cell*, 3 (8), 747-8.
- Araujo-Bazan, L., et al. (2009), 'Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genet Biol*, 46 (6-7), 506-15.
- Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2008), 'Convergent energy and stress signaling', *Trends Plant Sci*, 13 (9), 474-82.
- Baidya, S., et al. (2011), 'Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production', *Appl Environ Microbiol*, 77 (15), 5524-8.
- Bayram, O. and Braus, G. H. (2012), 'Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins', *FEMS Microbiol Rev*, 36 (1), 1-24.
- Bayram, O., et al. (2009), 'The protein kinase ImeB is required for light-mediated inhibition of sexual development and for mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 71 (5), 1278-95.
- (2010), 'Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems', *Fungal Genet Biol*, 47 (11), 900-8.
- (2008a), 'More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development', *Mol Biol Cell*, 19 (8), 3254-62.
- (2008b), 'VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism', *Science*, 320 (5882), 1504-6.
- Bergholtz, S., et al. (2001), 'The highly conserved DNA-binding domains of A-, B- and c-Myb differ with respect to DNA-binding, phosphorylation and redox properties', *Nucleic Acids Res*, 29 (17), 3546-56.
- Biedenkapp, H., et al. (1988), 'Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity', *Nature*, 335 (6193), 835-7.

- Bistis, G.N. (1983), 'Synchronous induction and development of ascogonia', *Neurospora News*, 30 (14).
- Blumenstein, A., et al. (2005), 'The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light', *Curr Biol*, 15 (20), 1833-8.
- Boyer, L. A., et al. (2002), 'Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes', *Mol Cell*, 10 (4), 935-42.
- Braus, G. H., Irniger, S., and Bayram, O. (2010), 'Fungal development and the COP9 signalosome', *Curr Opin Microbiol*, 13 (6), 672-6.
- Braus, G.H., Krappmann, S., Eckert, S.E. (2002), 'Sexual development in ascomycetes-fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. In: Osiewacz, H.D. (ed) *Molecular biology of fungal development*', Dekker, New York, 215-44.
- Brendeford, E. M., Andersson, K. B., and Gabrielsen, O. S. (1998), 'Nitric oxide (NO) disrupts specific DNA binding of the transcription factor c-Myb in vitro', *FEBS Lett*, 425 (1), 52-6.
- Brendeford, E. M., et al. (1997), 'Oncogenic point mutations induce altered conformation, redox sensitivity, and DNA binding in the minimal DNA binding domain of avian myeloblastosis virus v-Myb', *J Biol Chem*, 272 (7), 4436-43.
- Buck, M., et al. (2000), 'c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278 (2), G321-8.
- Busby, T. M., Miller, K. Y., and Miller, B. L. (1996), 'Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes', *Genetics*, 143 (1), 155-63.
- Busti, S., et al. (2010), 'Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*', *Sensors (Basel)*, 10 (6), 6195-240.
- Calvo, A. M. (2008), 'The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi', *Fungal Genetics and Biology*, 45 (7), 1053-1061.
- Cano-Dominguez, N., et al. (2008), 'NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*', *Eukaryot Cell*, 7 (8), 1352-61.
- Carlson, M., Osmond, B. C., and Botstein, D. (1981), 'Mutants of yeast defective in sucrose utilization', *Genetics*, 98 (1), 25-40.
- Casselton, L. and Zolan, M. (2002), 'The art and design of genetic screens: filamentous fungi', *Nat Rev Genet*, 3 (9), 683-97.
- Champe, S. P., Nagle, D. L., and Yager, L. N. (1994), 'Sexual sporulation', *Prog Ind Microbiol*, 29, 429-54.
- Cziferszky, A., Seiboth, B., and Kubicek, C. P. (2003), 'The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1', *Fungal Genet Biol*, 40 (2), 166-75.
- Davis, R.H. and de Serres, F.J. (1970), 'Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*', *Methods Enzymol*, 17, 79-143.

- Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., and Silar P. (2010), 'Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi (Borkovich, K.A. y Ebbole, D.J., eds)', *ASM Press, Washintong, DC.*, 501-35.
- Dowzer, C. E. and Kelly, J. M. (1989), 'Cloning of the creA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression', *Curr Genet*, 15 (6), 457-9.
- Du, H., et al. (2009), 'Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family', *Biochemistry (Mosc)*, 74 (1), 1-11.
- Dubos, C., et al. (2010), 'MYB transcription factors in Arabidopsis', *Trends Plant Sci*, 15 (10), 573-81.
- Dyer, P. S. and O'Gorman, C. M. (2012), 'Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species', *FEMS Microbiol Rev*, 36 (1), 165-92.
- Eisendle, M., et al. (2006), 'The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*', *Eukaryot Cell*, 5 (10), 1596-603.
- Etxebeste, O., et al. (2010), '*Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules', *Trends Microbiol*, 18 (12), 569-76.
- (2009), 'The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 73 (5), 775-89.
- (2008), 'Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*', *Eukaryot Cell*, 7 (1), 38-48.
- Feller, A., et al. (2011), 'Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors', *Plant J*, 66 (1), 94-116.
- Gabrielsen, O. S., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1991), 'Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif', *Science*, 253 (5024), 1140-3.
- Galagan, J. E., et al. (2005), 'Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*', *Nature*, 438 (7071), 1105-15.
- Garzia, A., et al. (2010), 'The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 75 (5), 1314-24.
- (2009), '*Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB', *Mol Microbiol*, 71 (1), 172-84.
- Ghillebert, R., et al. (2011), 'The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation', *FEBS J*, 278 (21), 3978-90.
- Grasser, F. A., et al. (1992), 'A highly conserved cysteine in the v-Myb DNA-binding domain is essential for transformation and transcriptional trans-activation', *Oncogene*, 7 (5), 1005-9.
- Guehmann, S., et al. (1992), 'Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding', *Nucleic Acids Res*, 20 (9), 2279-86.
- Han, K. H., et al. (2010), 'Simple identification of veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*', *J Microbiol*, 48 (6), 885-7.
- (2001), 'The nsdD gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 41 (2), 299-309.
- Han, K. H., et al. (2008), 'The *Aspergillus nidulans* esdC (early sexual development) gene is

- necessary for sexual development and is controlled by veA and a heterotrimeric G protein', *Fungal Genet Biol*, 45 (3), 310-318.
- Han, K. H., Seo, J. A., and Yu, J. H. (2004), 'A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 51 (5), 1333-45.
- Hardie, D. G., Carling, D., and Carlson, M. (1998), 'The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?', *Annu Rev Biochem*, 67, 821-55.
- Hardie, D. G., Hawley, S. A., and Scott, J. W. (2006), 'AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept', *J Physiol*, 574 (Pt 1), 7-15.
- Heine, G. F., Hernandez, J. M., and Grotewold, E. (2004), 'Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding', *J Biol Chem*, 279 (36), 37878-85.
- Hong, S. P. and Carlson, M. (2007), 'Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress', *J Biol Chem*, 282 (23), 16838-45.
- Imamura, S., et al. (2009), 'R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (30), 12548-53.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990), 'High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *Gene*, 96 (1), 23-8.
- Kafer, E. (1965), 'Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*', *Genetics*, 52 (1), 217-32.
- (1977), 'Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations', *Adv Genet*, 19, 33-131.
- Kawasaki, L. and Aguirre, J. (2001), 'Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*', *J Bacteriol*, 183 (4), 1434-40.
- Kawasaki, L., et al. (1997), 'Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress', *J Bacteriol*, 179 (10), 3284-92.
- (2002), 'SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 45 (4), 1153-63.
- Kim, H., et al. (2002), 'The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genet Biol*, 37 (1), 72-80.
- Kim, H. R., et al. (2009), 'The nsdC gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*', *Genetics*, 182 (3), 771-83.
- Kirk, K. E. and Morris, N. R. (1991), 'The tubB alpha-tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*', *Genes Dev*, 5 (11), 2014-23.
- Klempnauer, K. H., Gonda, T. J., and Bishop, J. M. (1982), 'Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene', *Cell*, 31 (2 Pt 1), 453-63.
- Krappmann, S., et al. (2006), 'The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis', *Mol Microbiol*, 61 (1), 76-88.

- Kuchin, S., Vyas, V. K., and Carlson, M. (2002), 'Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation', *Mol Cell Biol*, 22 (12), 3994-4000.
- Kurtz, M. B. and Champe, S. P. (1981), 'Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development', *J Bacteriol*, 148 (2), 629-38.
- Kwon, N. J., et al. (2012), 'The putative guanine nucleotide exchange factor RicA mediates upstream signaling for growth and development in *Aspergillus*', *Eukaryot Cell*, 11 (11), 1399-412.
- Kwon, N. J., Shin, K. S., and Yu, J. H. (2010a), 'Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genet Biol*, 47 (12), 981-93.
- Kwon, N. J., et al. (2010b), 'FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 77 (5), 1203-19.
- Langfelder, K., et al. (2003), 'Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi', *Fungal Genet Biol*, 38 (2), 143-58.
- 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 (4), 1241-55.
- Lara-Rojas, F. (2012), 'El papel de las cinasas MAP SakA y MpkC y los factores transcripcionales AtfA y NapA en la diferenciación celular y la respuesta al estrés en el hongo *Aspergillus nidulans*', *Tesis de Doctorado*, UNAM.
- Lara-Rojas, F., et al. (2011), '*Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions', *Mol Microbiol*, 80 (2), 436-54.
- Lea, U. S., et al. (2007), 'Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway', *Planta*, 225 (5), 1245-53.
- Lee, J. I., et al. (2004), 'Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, chsA, chsB, and chsC, in response to developmental status and environmental factors', *Fungal Genet Biol*, 41 (6), 635-46.
- Lee, S. H., et al. (2009), 'GzSNF1 is required for normal sexual and asexual development in the ascomycete *Gibberella zeae*', *Eukaryot Cell*, 8 (1), 116-27.
- Lin, Y., et al. (2011), 'A putative transcription factor MYT1 is required for female fertility in the ascomycete *Gibberella zeae*', *PLoS One*, 6 (10), e25586.
- (2012), 'A putative transcription factor MYT2 regulates perithecius size in the ascomycete *Gibberella zeae*', *PLoS One*, 7 (5), e37859.
- Malagnac, F., et al. (2004), 'Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*', *Fungal Genet Biol*, 41 (11), 982-97.
- Marhoul, J. F. and Adams, T. H. (1995), 'Identification of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans* by overexpression', *Genetics*, 139 (2), 537-47.

- Márquez-Fernández, O. , et al. (2007), 'The phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is essential for *Aspergillus nidulans* primary and secondary metabolism and for asexual development', *Eukaryot Cell*, 6 (4), 710-20.
- Marshall, M. A. and Timberlake, W. E. (1991), '*Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression', *Mol Cell Biol*, 11 (1), 55-62.
- Mathieu, M. and Felenbok, B. (1994), 'The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator', *Embo J*, 13 (17), 4022-7.
- McCartney, R. R., Rubenstein, E. M., and Schmidt, M. C. (2005), 'Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases', *Curr Genet*, 47 (6), 335-44.
- McCully, K. S. and Forbes, E. (1965), 'The use of p-fluorophenylalanine with 'master strains' of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups', *Genet Res*, 6 (3), 352-9.
- Meneses, E., et al. (2010), 'The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*', *Gene*, 455 (1-2), 32-42.
- 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 (5), 859-68.
- Mo, X., et al. (2005), 'Histone H3 tail positioning and acetylation by the c-Myb but not the v-Myb DNA-binding SANT domain', *Genes Dev*, 19 (20), 2447-57.
- Myrset, A. H., et al. (1993), 'DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein', *Embo J*, 12 (12), 4625-33.
- Nadal, M., Garcia-Pedrajas, M. D., and Gold, S. E. (2010), 'The snf1 gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes', *Phytopathology*, 100 (12), 1364-72.
- Navarro, R. E., et al. (1996), 'catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase', *Curr Genet*, 29 (4), 352-9.
- Nayak, T., et al. (2006), 'A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*', *Genetics*, 172 (3), 1557-66.
- Ness, S. A. (2003), 'Myb protein specificity: evidence of a context-specific transcription factor code', *Blood Cells Mol Dis*, 31 (2), 192-200.
- Ni, M. and Yu, J. H. (2007), 'A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*', *PLoS One*, 2 (10), e970.
- Ogata, K., et al. (1994), 'Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices', *Cell*, 79 (4), 639-48.
- (1996), 'The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation', *Nat Struct Biol*, 3 (2), 178-87.
- (1995), 'Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb', *Nat Struct Biol*, 2 (4), 309-20.
- Oh, I. H. and Reddy, E. P. (1999), 'The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis', *Oncogene*, 18 (19), 3017-33.
- Ording, E., et al. (1994), 'Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein', *Eur J Biochem*, 222 (1), 113-20.

- Orlova, M., et al. (2006), 'Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*', *Eukaryot Cell*, 5 (11), 1831-7.
- Oshero, N. and May, G. (2000), 'Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis', *Genetics*, 155 (2), 647-56.
- Ospina-Giraldo, M. D., Mullins, E., and Kang, S. (2003), 'Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*', *Curr Genet*, 44 (1), 49-57.
- Paoletti, M., et al. (2007), 'Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*', *Curr Biol*, 17 (16), 1384-9.
- Park, H. S. and Yu, J. H. (2012), 'Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi', *Curr Opin Microbiol*, 15 (6), 669-77.
- Pascon, R. C. and Miller, B. L. (2000), 'Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* requires Dopey (DopA), a member of a novel family of leucine zipper-like proteins conserved from yeast to humans', *Mol Microbiol*, 36 (6), 1250-64.
- Pinson, B., Gabrielsen, O. S., and Daignan-Fornier, B. (2000a), 'Redox regulation of AMP synthesis in yeast: a role of the Bas1p and Bas2p transcription factors', *Mol Microbiol*, 36 (6), 1460-9.
- Pinson, B., et al. (2001), 'Highly conserved features of DNA binding between two divergent members of the Myb family of transcription factors', *Nucleic Acids Res*, 29 (2), 527-35.
- (1998), 'Mutations in the yeast Myb-like protein Bas1p resulting in discrimination between promoters in vivo but not in vitro', *Nucleic Acids Res*, 26 (17), 3977-85.
- (2000b), 'Signaling through regulated transcription factor interaction: mapping of a regulatory interaction domain in the Myb-related Bas1p', *Nucleic Acids Res*, 28 (23), 4665-73.
- Poeggeler, S., Nowrousian, M., and Kueck, U. (2006), 'Fruiting-body development in ascomycetes.', *In the Mycota*, Vol. I. Kues, U., and Fischer, R. (eds). Berlin Heidelberg New York: Springer., 325-55.
- Polge, C. and Thomas, M. (2007), 'SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?', *Trends Plant Sci*, 12 (1), 20-8.
- Pontecorvo, G., et al. (1953), 'The genetics of *Aspergillus nidulans*', *Adv Genet*, 5, 141-238.
- Purschwitz, J., Muller, S., and Fischer, R. (2009), 'Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB', *Mol Genet Genomics*, 281 (1), 35-42.
- Purschwitz, J., et al. (2008), 'Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*', *Curr Biol*, 18 (4), 255-9.
- Rajagopalan, R., et al. (2006), 'A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*', *Genes Dev*, 20 (24), 3407-25.
- Ramsay, R. G. and Gonda, T. J. (2008), 'MYB function in normal and cancer cells', *Nat Rev Cancer*, 8 (7), 523-34.
- Rodriguez-Sanchez, L., et al. (2011), 'The fission yeast rDNA-binding protein Reb1 regulates G1 phase under nutritional stress', *J Cell Sci*, 124 (Pt 1), 25-34.

- Rodriguez-Urra, A. B., et al. (2012), 'Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*', *ACS Chem Biol*, 7 (3), 599-606.
- Rosen, S., Yu, J. H., and 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 (20), 5592-600.
- Roy, P., Lockington, R. A., and Kelly, J. M. (2008), 'CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA', *Fungal Genet Biol*, 45 (5), 657-70.
- Rubio, V., et al. (2001), 'A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae', *Genes Dev*, 15 (16), 2122-33.
- Saikumar, P., Murali, R., and Reddy, E. P. (1990), 'Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (21), 8452-6.
- Sakura, H., et al. (1989), 'Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the *c-myb* protooncogene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (15), 5758-62.
- Sánchez, O. and Aguirre, J. (1996), 'Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of germinated conidia', *Fungal Genet. Newsl.*, 43, 48-51.
- Sarikaya Bayram, O., et al. (2010), 'LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity', *PLoS Genet*, 6 (12), e1001226.
- Scherer, M., et al. (2002), '*Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor *StuA*', *Eukaryot Cell*, 1 (5), 725-35.
- Schmidt, M. C. and McCartney, R. R. (2000), 'beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition', *Embo J*, 19 (18), 4936-43.
- Seo, J. A. and Yu, J. H. (2006), 'The phosducin-like protein PhnA is required for Gbetagamma-mediated signaling for vegetative growth, developmental control, and toxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*', *Eukaryot Cell*, 5 (2), 400-10.
- Seo, J. A., Guan, Y., and Yu, J. H. (2006), 'FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression', *Genetics*, 172 (3), 1535-44.
- Seo, J. A., Han, K. H., and Yu, J. H. (2005), 'Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*', *Genetics*, 171 (1), 81-9.
- Serpa, V., et al. (2007), 'Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation', *Biochem Biophys Res Commun*, 361 (4), 1048-53.
- Sewall, T. C., Mims, C. W., and Timberlake, W. E. (1990a), '*abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*', *Plant Cell*, 2 (8), 731-9.
- (1990b), 'Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains', *Dev Biol*, 138 (2), 499-508.
- Shen, W., et al. (1998), 'The *Neurospora rca-1* Gene Complements an *Aspergillus flbD* Sporulation mutant but Has No Identifiable Role in *Neurospora* Sporulation', *Genetics*, 148, 1031-41.

- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (1995), 'Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene', *Microbiology*, 141, 21-8.
- Sohn, K.S. Yoon and K.T. (2002), 'Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans*', *Mycobiology*, 30 (3), 117-27.
- Soid, Lourdes Gabriela (2006), '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*', Doctorado (UNAM).
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O., and Aguirre, J. (2006), 'TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 59 (3), 854-69.
- Stinnett, S. M., et al. (2007), '*Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light', *Mol Microbiol*, 63 (1), 242-55.
- Stober-Grasser, U., et al. (1992), 'The Myb DNA-binding domain is highly conserved in *Dictyostelium discoideum*', *Oncogene*, 7 (3), 589-96.
- Strauss, J., et al. (1995), 'Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*', *FEBS Lett*, 376 (1-2), 103-7.
- Swart, K., et al. (2001), 'Isolation and characterization of sexual sporulation mutants of *Aspergillus nidulans*', *Fungal Genet Biol*, 33 (1), 25-35.
- Tahirov, T. H., et al. (2002), 'Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter', *Cell*, 108 (1), 57-70.
- Tamame, M., Antequera, F., and Santos, E. (1988), 'Developmental characterization and chromosomal mapping of the 5-azacytidine-sensitive fluF locus of *Aspergillus nidulans*', *Mol Cell Biol*, 8 (8), 3043-50.
- Tamame, M., et al. (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 (12), 2287-97.
- Thon, M., et al. (2007), 'The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response', *J Biol Chem*, 282 (37), 27259-69.
- Timberlake, W. E. and Clutterbuck, A. J. (1994), 'Genetic regulation of conidiation', *Prog Ind Microbiol*, 29, 383-427.
- Todd, R. B., Hynes, M. J., and Andrianopoulos, A. (2006), 'The *Aspergillus nidulans* rcoA gene is required for veA-dependent sexual development', *Genetics*, 174 (3), 1685-8.
- Todd, R. B., Davis, M. A., and Hynes, M. J. (2007), 'Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction', *Nat Protoc*, 2 (4), 811-21.
- Toews, M. W., 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 (6), 383-9.
- Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S., and Walton, J. D. (2000), 'The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize', *Plant Cell*, 12 (2), 237-48.

- Tsitsigiannis, D. I., Zarnowski, R., and Keller, N. P. (2004a), 'The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*', *J Biol Chem*, 279 (12), 11344-53.
- Tsitsigiannis, D. I., et al. (2004b), 'Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*', *Eukaryot Cell*, 3 (6), 1398-411.
- (2005), 'Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*', *Microbiology*, 151 (Pt 6), 1809-21.
- Tuncher, A., et al. (2004), 'A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 52 (1), 227-41.
- Vargas-Perez, I., et al. (2007), 'Response regulators *SrrA* and *SskA* are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*', *Eukaryot Cell*, 6 (9), 1570-83.
- Vienken, K. and Fischer, R. (2006), 'The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor *NosA* controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*', *Mol Microbiol*, 61 (2), 544-54.
- Vienken, K., Scherer, M., and Fischer, R. (2005), 'The Zn(II)2Cys6 putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture', *Genetics*, 169 (2), 619-30.
- Vincent, O., et al. (2001), 'Subcellular localization of the *Snf1* kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism', *Genes Dev*, 15 (9), 1104-14.
- Wang, C. L., Shim, W. B., and Shaw, B. D. (2010), '*Aspergillus nidulans* striatin (*StrA*) mediates sexual development and localizes to the endoplasmic reticulum', *Fungal Genet Biol*, 47 (10), 789-99.
- Wei, H., et al. (2001), '*Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (*mutanase*), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes *mutan*', *Fungal Genet Biol*, 34 (3), 217-27.
- (2004), 'A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation', *Fungal Genet Biol*, 41 (2), 148-56.
- Weston, K. (1992), 'Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins', *Nucleic Acids Res*, 20 (12), 3043-9.
- 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 (4), 491-502.
- Wieser, J., et al. (1994), 'Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*', *Curr Genet*, 27 (1), 62-9.
- Wu, J. and Miller, B. L. (1997), '*Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression', *Mol Cell Biol*, 17 (10), 6191-201.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E., and Timberlake, W. E. (1984), 'Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (5), 1470-4.

- Yi, M., et al. (2008), 'MoSNF1 regulates sporulation and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*', *Fungal Genet Biol*, 45 (8), 1172-81.
- Yu, J. H., Mah, J. H., and Seo, J. A. (2006), 'Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli', *Eukaryot Cell*, 5 (10), 1577-84.
- 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 (19), 5184-90.
- Yu, J. H., et al. (2004), 'Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi', *Fungal Genet Biol*, 41 (11), 973-81.

APÉNDICE

I. Figuras suplementarias.

Con la finalidad de encontrar algunos genes blanco de FlbD durante la conidiación se realizó un análisis de microarreglos. Para ello cultivos líquidos de las cepas CLK43 (WT) y TJAQ15 ($\Delta flbD$) se crecieron por 18 h (0 h de conidiación) y se indujeron a conidiar durante 8 h como se indica en material en métodos. RNA total de las muestras tomadas al tiempo indicado se sometió a análisis de microarreglos. Los datos obtenidos corresponden a una sola replica por lo que se consideran preliminares. En el microarreglo se analizaron en total 6367 genes, de estos 4500 mostraron expresión basal. Se reportan los genes que presentaron más veces de cambio (valor Z) en la mutante $\Delta flbD$ con respecto a la silvestre.

Tabla S1. Genes que incrementan su nivel de expresión en una mutante $\Delta flbD$ después de 8h de inducción del desarrollo asexual. La proteína FlbD se requiere para reprimir estos genes durante la conidiación.

Gen	Valor Z	Descripción
AN7832.3	5.72	Deshidrogenasa de colina
AN6333.3	5.54	Proteína hipotética
AN11255.3	4.96	No identificado
AN2925.3	4.49	Factor-2 de ensamblaje del peroxisoma
AN5834.3	4.46	Proteína hipotética
AN0755.3	4.41	Proteína hipotética
AN0644.3	4.31	Factor de transcripción C2H2
AN1090.3	4.09	Proteína hipotética
AN10689.3	4.05	Proteína hipotética
AN0148.3	3.99	Proteína hipotética
AN10314.3	3.90	No identificado
AN7165.3	3.86	Proteína membranal de respuesta a estrés
AN1549.3	3.77	Proteína hipotética
AN4057.3	3.57	Proteína con dominio catalítico de especificidad dual de fosfatasa
AN5746.3	3.49	Enolasa
AN7808.3	3.46	Probable monooxigenasa de la biosíntesis de esterigmatocistina P450 STCS
AN2951.3	3.44	4 epimerasa de UDP glucosa
AN1653.3	3.39	Citidililtransferasa de fosfatidato
AN5564.3	3.33	Fosfatidil sintasa
AN1452.3	3.28	Proteína nucleolar 12
AN11448.3	3.28	Proteína hipotética

AN2530.3	3.22	Proteína similar a hsp30
AN8165.3	3.19	Proteína hipotética
AN9310.3	3.18	Proteína hipotética
AN1551.3	3.17	Proteína hipotética
AN7485.3	3.14	Transportador de sideróforos de hierro mirC
AN3223.3	3.12	Subunidad alpha de la 6-fosfofructocinase
AN1543.3	3.11	Fumarato reductasa Osm1
AN4859.3	3.08	H(+)ATPasa de membrana plasmática
AN2286.3	2.93	Alcohol deshidrogenasa III
AN2438.3	2.90	Proteína que une ATP
AN4897.3	2.90	Proteína hipotética
AN6083.3	2.88	Proteína ribosomal 60S L10-B
AN8665.3	2.87	Proteína hipotética
AN11545.3	2.87	No identificado
AN8741.3	2.66	Proteína hipotética
AN3468.3	2.64	Histona H2A
AN6366.3	2.61	NADH-citocromo b5 reductasa 1
AN5744.3	2.53	Proteína de la familia 14-3-3
AN3573.3	2.42	Aldehído deshidrogenada
AN0734.3	2.40	Histona H4
AN7175.3	2.39	Metiltransferasa ubiE/COQ5
AN0554.3	2.23	Aldehído deshidrogenasa ALDH
AN0267.3	2.22	Calmodulina
AN8218.3	2.17	Sulfidriilo oxidasa Sox
AN4991.3	2.16	Proteína de resistencia a aureobasidina Aur1
AN1620.3	2.12	Glicosil transferasa
AN6791.3	2.11	Sintasa de policétidos
AN8692.3	2.10	Peroxiredoxina pmp20 putativa
AN7567.3	2.02	Glutaredoxina-4 monotiol
AN9124.3	1.93	Proteína de choque térmico
AN0799.3	1.91	Proteína hipotética
AN7513.3	1.85	NapA
AN7903.3	1.83	Sintasa de policétidos
AN6140.3	1.79	CfwA
AN8333.3	1.76	PhiA
AN1640.3	1.75	Proteína hipotética
AN9339.3	1.75	CatB
AN8630.3	1.73	Proteína con dominio DUF953
AN2421.3	1.73	F1bC
AN2713.3	1.70	Proteína hipotética
AN3588.3	1.66	Subunidad alfa-1,6-manosiltransferasa
AN7636.3	1.66	Alcohol deshidrogenada

Tabla S2. Genes que disminuyen su nivel de expresión en una mutante *ΔflbD* después de 8h de inducción del desarrollo asexual. La proteína FlbD se requiere para inducir estos genes durante la conidiación.

Gen	Valor Z	Descripción
AN4251.3	-5.05	Proteína ribosomal S2 40S
AN1222.3	-4.13	S-adenosilmetionina sintetasa
AN5699.3	-3.16	Proteína hipotética
AN7531.3	-3.06	Proteína hipotética
AN8951.3	-2.98	Proteína hipotética
AN10410.3	-2.75	Transportador de monocarboxilato
AN1555.3	-2.59	Quitina sintasa D
AN3757.3	-2.51	Familia de proteínas BEM46
AN6133.3	-2.24	Subunidad de la flavoproteína fumarato reductasa
AN4169.3	-2.08	Proteína de silenciamiento del telomere Zds1
AN2986.3	-2.03	Proteína con dominio EF
AN5577.3	-1.94	Superóxido dismutasa de manganeso
AN8847.3	-1.91	Proteína de unión a NTP
AN4230.3	-1.90	Familia de enzimas CAIB/BAIF
AN10744.3	-1.89	No identificado
AN3496.3	-1.84	Proteína hipotética
AN1821.3	-1.84	Proteína que contiene dominio de unión a FAD
AN0016.3	-1.75	Proteína hipotética (contiene dominios de NRPS)
AN2845.3	-1.71	Proteína hipotética
AN9179.3	-1.67	Aldo/ceto reductasa
AN1310.3	-1.64	Proteína hipotética
AN6075.3	-1.53	Fenilalanina amonio-liasa

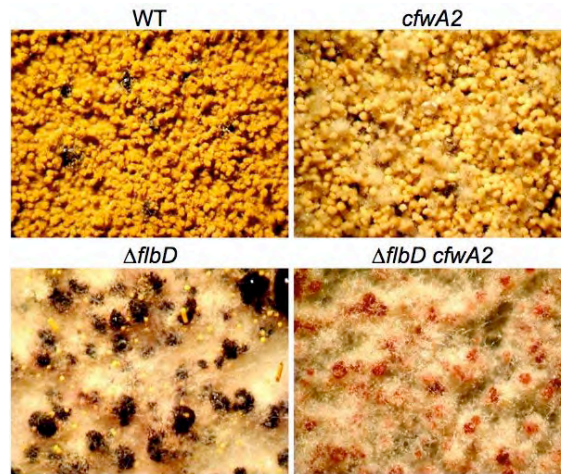


Figura S1. El pigmento que se acumula con las ascosporas desnudas depende de CfwA. Las cepas CLK43 (WT), CRO1 (*cfwA2*), TJAQ15 ($\Delta flbD$) y CJAQ ($\Delta flbD$ *cfwA2*) se inocularon en punto en placas de medio mínimo suplementado. La inducción del desarrollo sexual se realizó a 30°C durante 10 días en placas privadas de oxígeno. Fotografías tomadas con un aumento 8x.

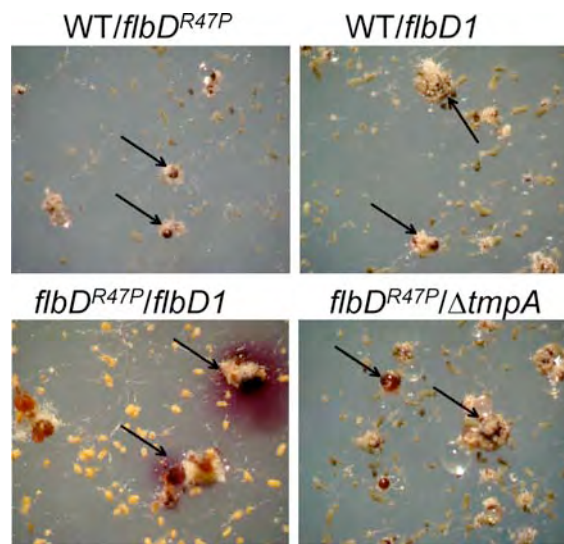


Figura S2. El fenotipo sexual de una mutante en *flbD* es recesivo en diploides. Los diploides WT/*flbD*^{R47P}, WT/*flbD1* y *flbD*^{R47P}/Δ*tmpA* muestran desarrollo sexual silvestre mientras que en el diploide *flbD*^{R47P}/*flbD1* se producen ascosporas desnudas. Cepas CJAQ10 (*fluF1-1/flbD1*), CJAQ21 (WT/*flbD1*) y CJAQ18 (WT/*fluF1-2*) se inocularon en punto en placas de agar, y se incubaron a 37°C por 5 días. La inducción sexual se llevó a cabo con cilindros pequeños de SC (medio sexual para *N. crassa*), y se incubaron 8 días más. Las imágenes se tomaron con el microscopio estereoscópico, aumento 8x. Las flechas indican los celsitotecios o cúmulos de ascosporas desnudas según corresponda.

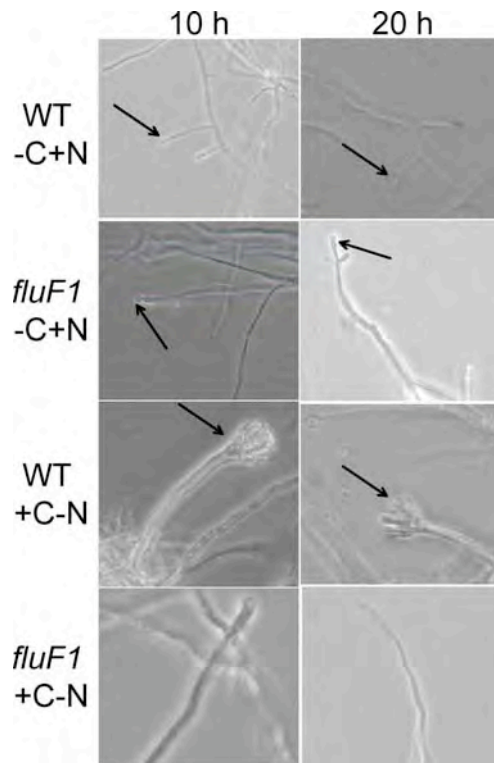


Figura S3. Las cepas *fluF1* (*flbD*^{R47P}) son incapaces de inducir la conidiación en respuesta a la privación de nitrógeno. El micelio de las cepas CLK43 (WT) y CAF2 (*fluF1*) se creció por 18 h en cultivo líquido y se transfirió al mismo medio pero carente de carbono (-C) y/o nitrato (-N). Después de 10 h y 20 h se realizó la observación al microscopio óptico con un aumento de 40x. Las fechas indican los conidióforos reducidos (-C) y los conidióforos completos (-N).

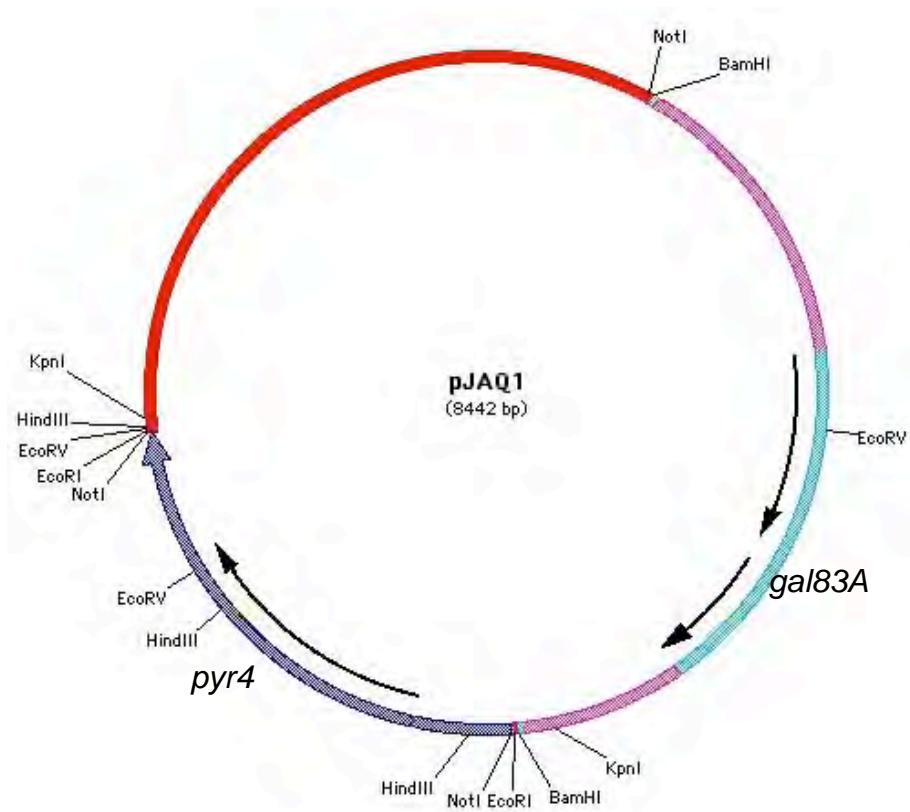


Figura S4. Mapa del plásmidos pJAQ1. El plásmido pJAQ1 se obtuvo por clonación del gen *gal83A* en el vector pLK26 en el sitio e restricción *BamHI*. Los oligonucleótidos empleados para amplificar *gal83A* y clonar en el vector se indican en la Tabla 3 de la sección de Material y métodos. El plásmido confiere resistencia a ampicilina. Se indican algunos sitios de restricción comunes.

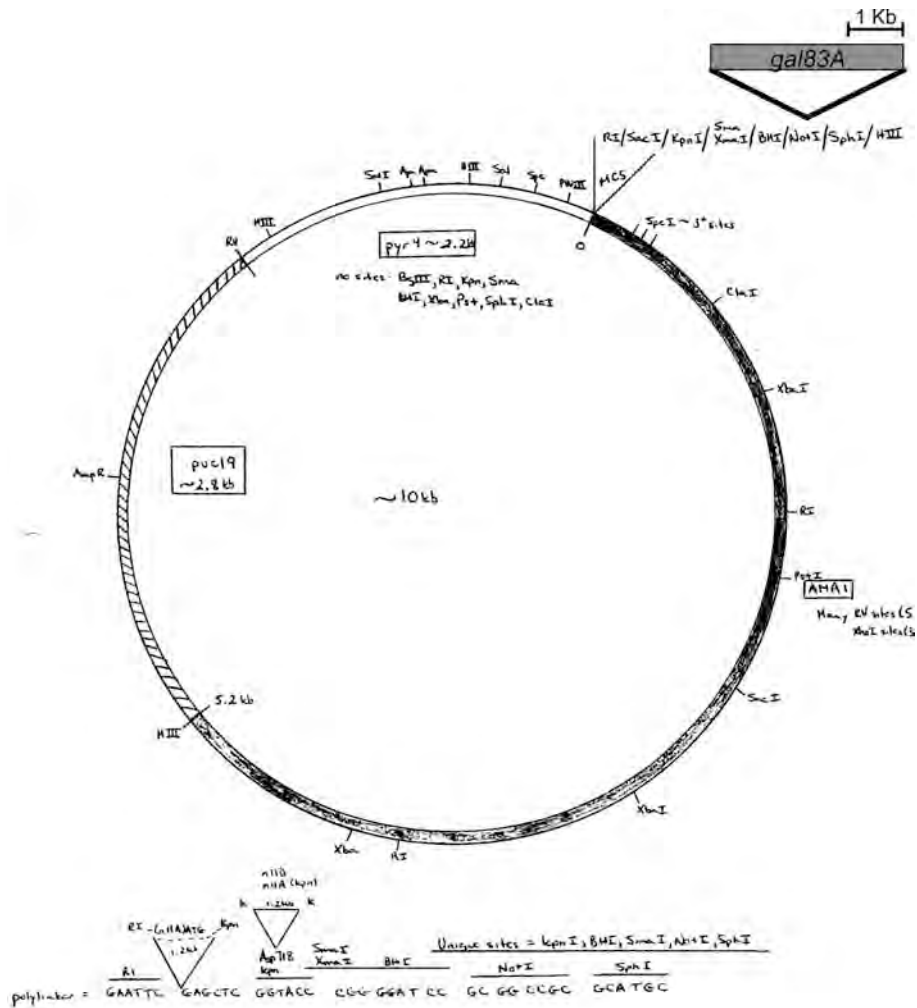


Figura S5. Mapa del plásmidos pJAQ2. El plásmido pJAQ2 se obtuvo por clonación del gen *gal83A* en el plásmido de replicación autónoma pRG3 AMAI NotI usando el sitio de restricción *NotI*. Los oligonucleótidos empleados para amplificar *gal83A* y clonar en el vector se indican en la Tabla 3 de la sección de Material y métodos. El plásmido confiere resistencia a ampicilina. Se indican algunos sitios de restricción.

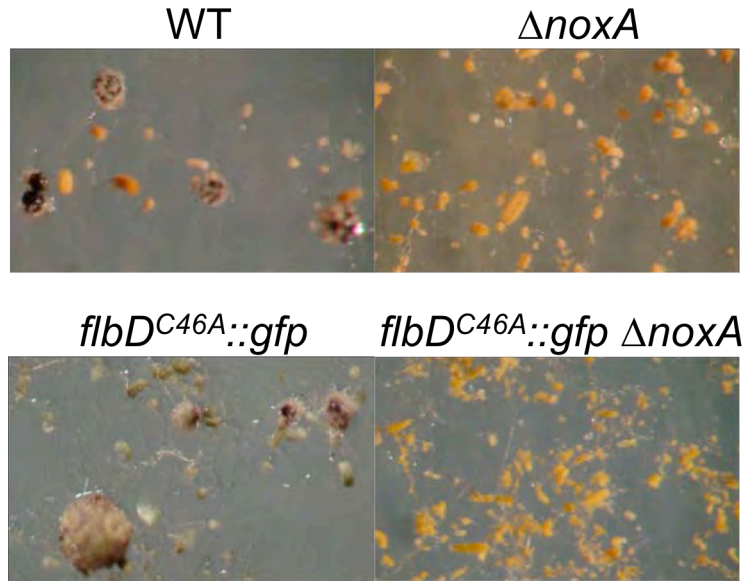


Figura S6. La mutante *flbD^{C46A}::gfp ΔnoxA* no forma el peridio del cuerpo fructífero. Cepas CLK43 (WT), CAH4 (*ΔnoxA*), TJAQ51 (*flbD^{C46A}::gfp*) y CJAQ49 (*flbD^{C46A}::gfp ΔnoxA*) se inocularon en punto en placas de agar, y se incubaron a 37°C por 5 días. La inducción sexual se llevó a cabo con cilindros pequeños de SC (medio sexual para *N. crassa*), y se incubaron 8 días más. Las imágenes se tomaron con el microscopio estereoscópico, aumento 8x.

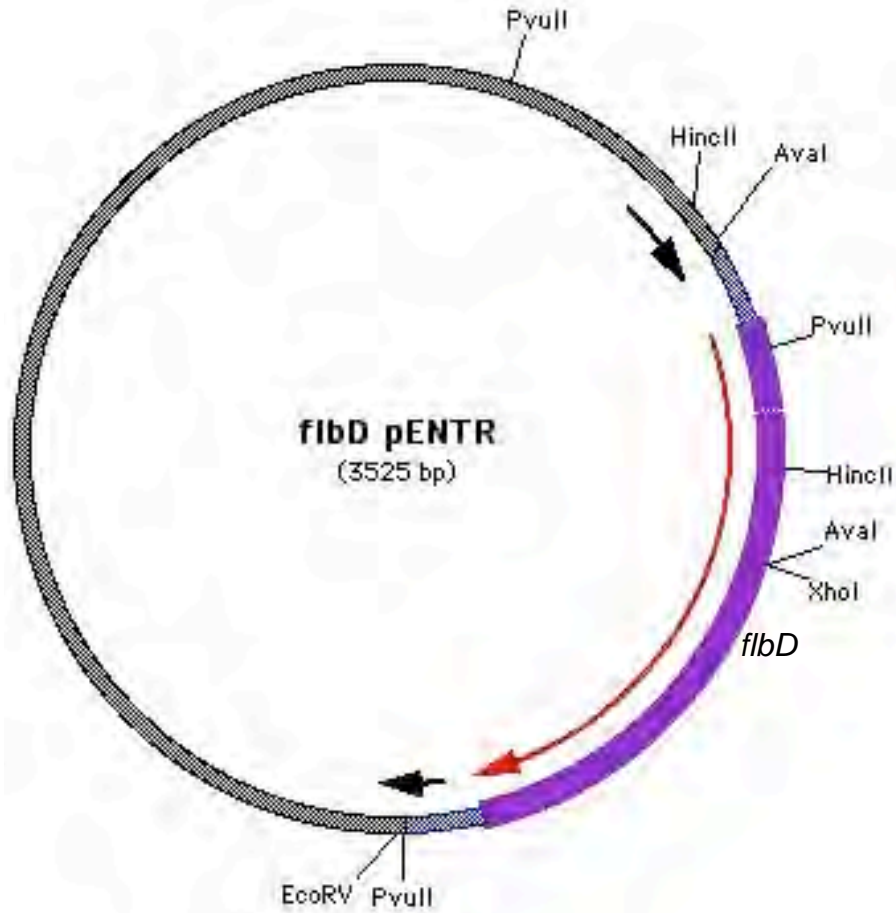


Figura S7. Mapa de los plásmidos pJAQ3-8. El ORF de *flbD* silvestre o con la mutación deseada (substituciones en la proteína FlbD C46D, C46S, C46A, R47P, R47K) amplificado con los oligonucleótidos For *flbD*pENTR y Rev *flbD*pENTR s/stop se clonó en el vector de entrada pENTR. El oligonucleótido For *flbD*pENTR contiene la secuencia CACC justo antes del codón de inicio, ATG, lo que permite clonar el amplicón en el vector pENTR. Los productos de PCR se clonaron en el vector pENTR en reacciones independientes con lo cual se obtuvieron los vectores pJAQ3, pJAQ4, pJAQ5, pJAQ6, pJAQ7, pJAQ8.

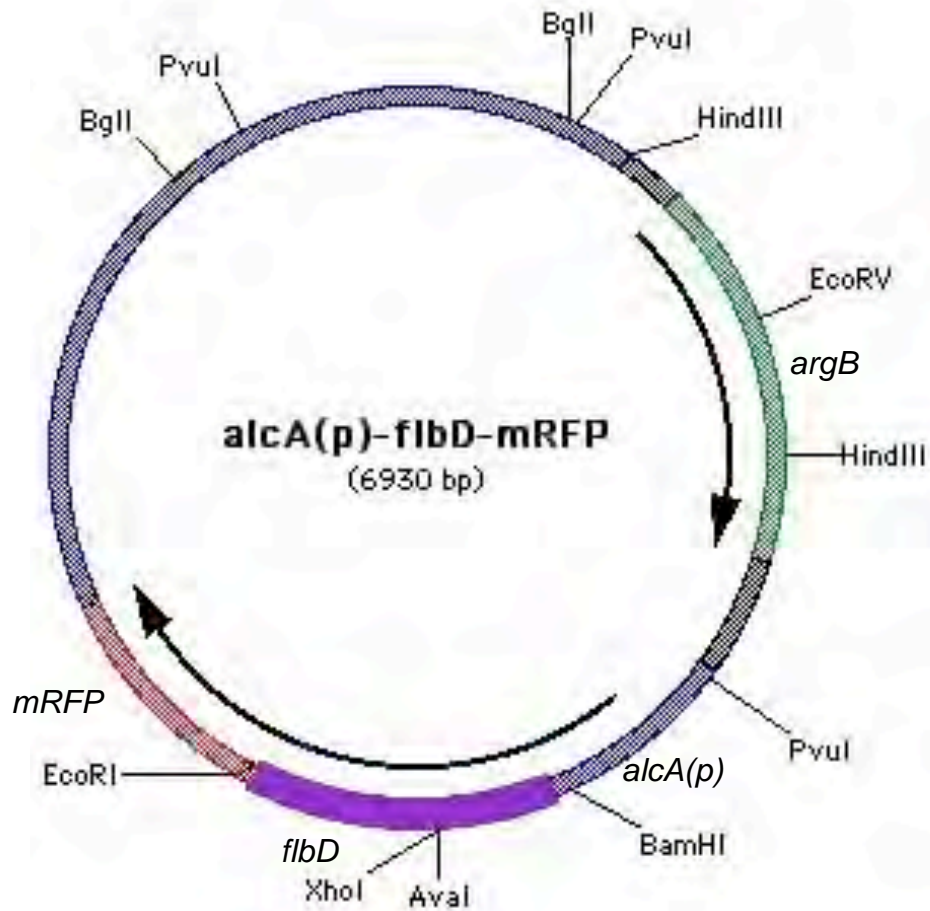


Figura S8. Mapa de los plásmidos pJAQ9-14. Los plásmidos pJAQ9, pJAQ10, pJAQ11, pJAQ12, pJAQ13, pJAQ14 contienen el alelo silvestre o mutante de *flbD* (substituciones en la proteína C46D, C46S, C46A, R47P, R47K) bajo el control del promotor inducible *alcA(p)* y fusionado a la proteína fluorescente mRFP. Los plásmidos se obtuvieron por recombinación *in vitro* de los plásmidos pENTR (pJAQ3-pJAQ8) y el vector pMT-mRFP siguiendo la metodología GATEWAY.

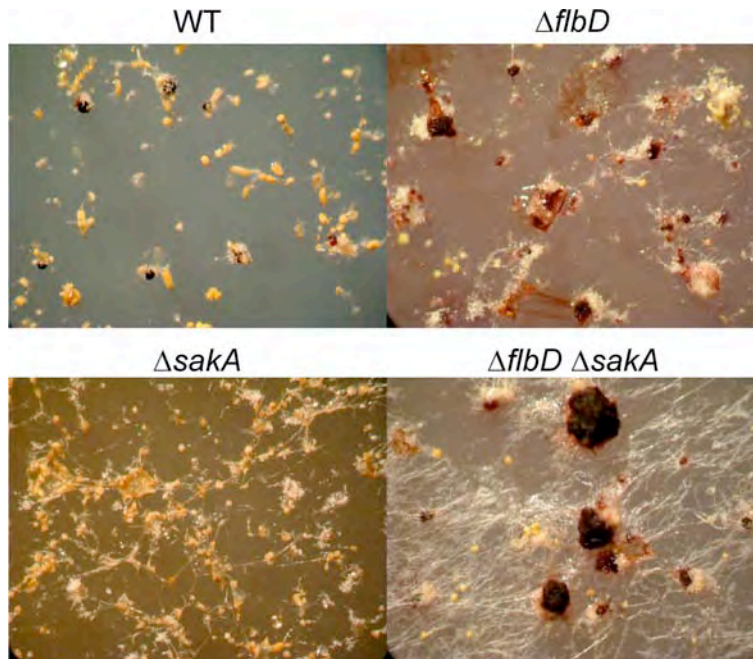


Figura S9. La mutante $\Delta sakA$ no produce cuerpos fructíferos en condiciones de limitación de nitrógeno. FbD parece reprimir la diferenciación sexual de una mutante $\Delta sakA$. Las cepas CLK43 (WT), TJAQ15 ($\Delta flbD$), TOL1 ($\Delta sakA$), CJAQ50 ($\Delta flbD \Delta sakA$) se inocularon en punto en placas de agar y se incubaron a 37°C durante 5 días. La inducción sexual se llevó a cabo con cilindros de medio sexual para *N. crassa*, y se incubaron a 37°C por 10 días más. Las imágenes se tomaron con un microscopio estereoscópico, magnificación 8x.

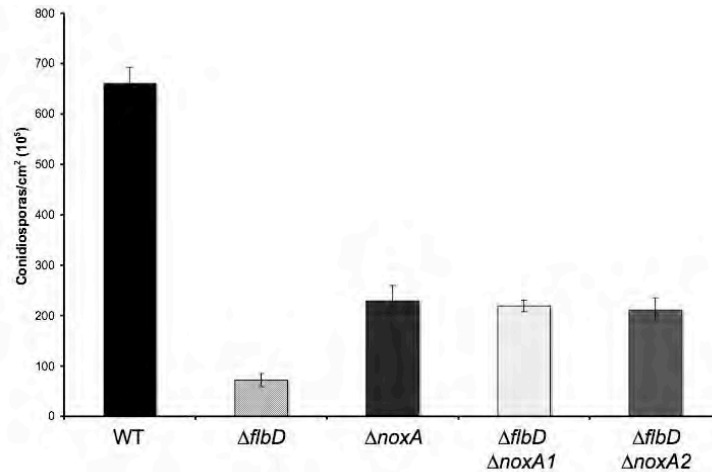
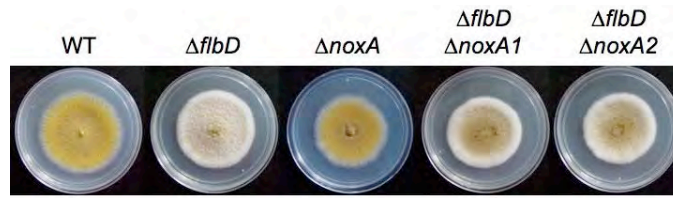


Figura S10. Fenotipo asexual de las mutantes dobles en el factor de transcripción FlbD y la enzima NoxA. Las mutantes dobles $\Delta flbD \Delta noxA$ muestran supresión parcial del fenotipo algodonoso. La producción de esporas es mayor en la doble mutante $\Delta flbD \Delta noxA$ que en la mutante $\Delta flbD$. Se muestra el crecimiento a 37°C durante 5 días en MM glucosa (MM).

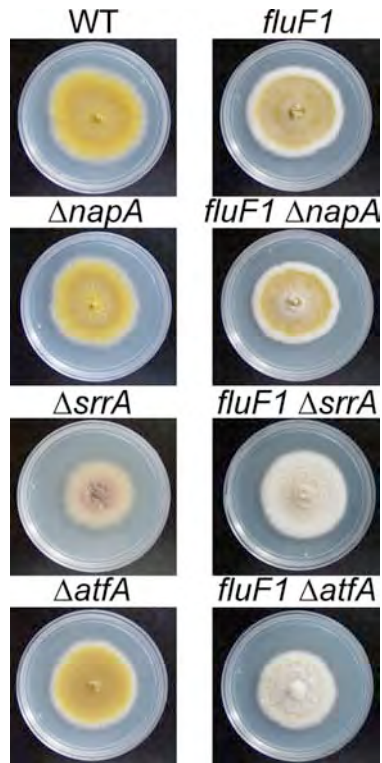


Figura S11. Fenotipo de las mutantes dobles en los factores de transcripción FluF, AtfA, NapA y SrrA. Una respuesta antioxidante deficiente produce una disminución en la esporulación. Las mutantes dobles *fluF1 ΔatfA*, *fluF1 ΔnapA* y *fluF1 ΔsrrA* muestran un fenotipo algodonoso, distinto de la mutante *fluF1* sencilla. Se muestra el crecimiento a 37°C durante 5 días en MM glucosa (MM).

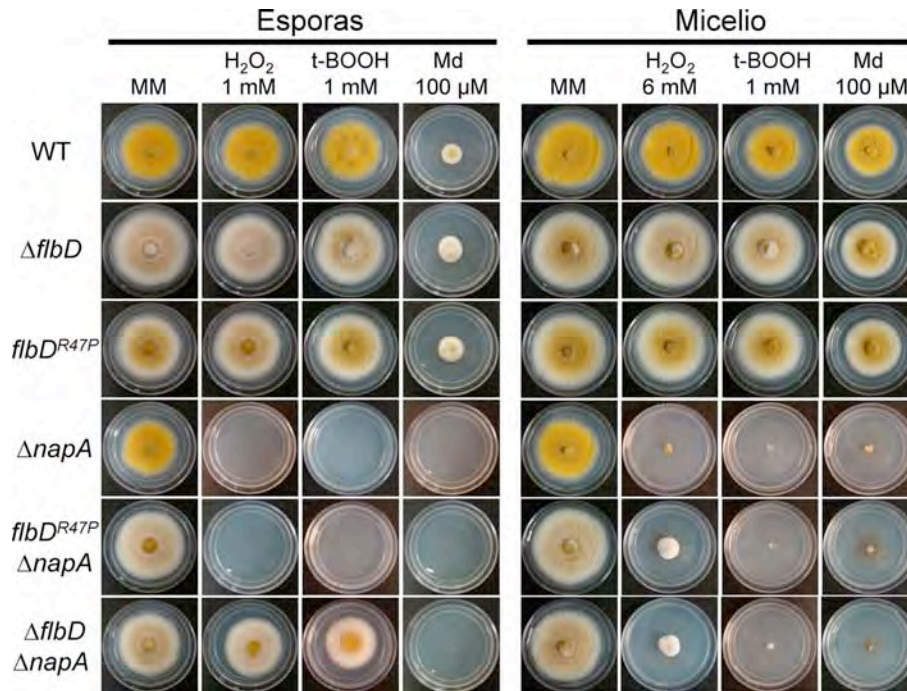


Figura S12. La respuesta antioxidante deficiente no inhibe el crecimiento de mutantes *flbD* en condiciones oxidantes. Conidias (10^4) o discos de micelio obtenidos del borde las colonias de 5 días de crecimiento de las cepas indicadas se sembraron en placas de MM con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), terbutilhidroperóxido (t-BOOH) y menadiona (Md) a las concentraciones indicadas. Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37°C.

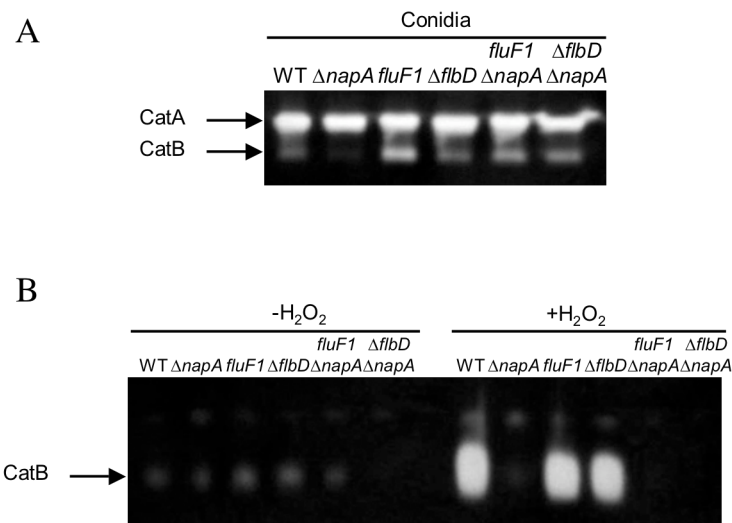


Figura S13. Las mutantes *fluF1* y *ΔflbD* no presentan una mayor inducción de la actividad de las catalasas A y B en presencia de H₂O₂. Geles nativos para detectar la actividad de catalasa utilizando 30 μg de proteínas de conidias (A) o micelio (B) (Cultivo de 12 h de crecimiento tratado 2 h con 0.5 mM de H₂O₂) de las cepas indicadas.

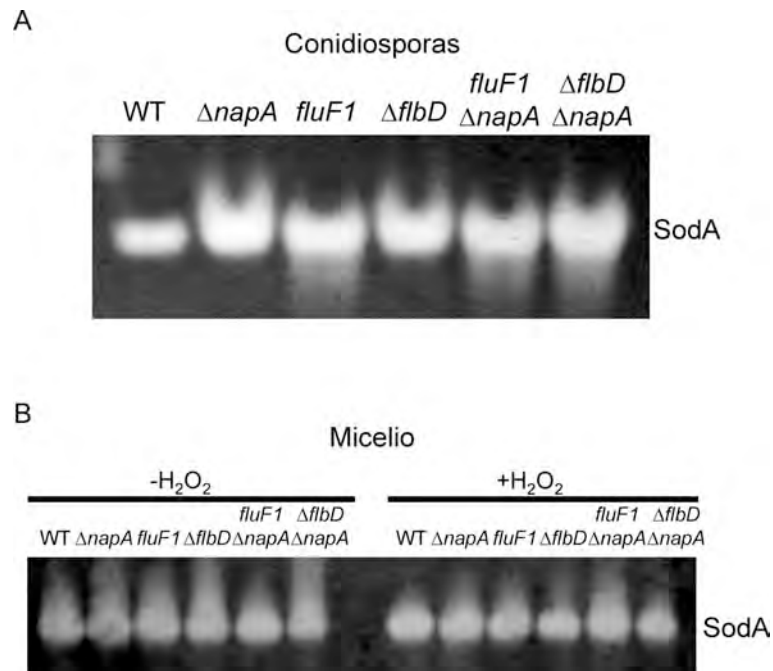


Figura S14. Las mutantes *fluF1* y $\Delta flbD$ no presentan una mayor inducción de la actividad de la superóxido dismutasa en presencia de H₂O₂. Geles nativos para detectar la actividad de la superóxido dismutasa utilizando 30 μ g de proteínas de conidias (A) o micelio (B) (Cultivo de 12 h de crecimiento tratado 2 h con 0.5 mM de H₂O₂) de las cepas indicadas.

II. Artículos publicados.

Arratia-Quijada J, Sánchez O, Scazzocchio C, Aguirre J. FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation. *Eukaryot Cell*. 2012 Sep;11(9):1132-42.

Arratia Jenny y Aguirre Jesús. Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol 16, Num 2, 2013.

FlbD, a Myb Transcription Factor of *Aspergillus nidulans*, Is Uniquely Involved in both Asexual and Sexual Differentiation

Jenny Arratia-Quijada,^a Olivia Sánchez,^a Claudio Scazzocchio,^{b,c} and Jesús Aguirre^a

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^a; Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud (XI), Orsay, France^b; and Department of Microbiology, Imperial College London, London, United Kingdom^c

In the fungus *Aspergillus nidulans*, inactivation of the *flbA* to *-E*, *fluG*, *fluF*, and *tmpA* genes results in similar phenotypes, characterized by a delay in conidiophore and asexual spore production. *flbB* to *-D* encode transcription factors needed for proper expression of the *brlA* gene, which is essential for asexual development. However, recent evidence indicates that FlbB and FlbE also have nontranscriptional functions. Here we show that *fluF1* is an allele of *flbD* which results in an R47P substitution. Amino acids C46 and R47 are highly conserved in FlbD and many other Myb proteins, and C46 has been proposed to mediate redox regulation. Comparison of $\Delta flbD$ and *flbD*^{R47P} mutants uncovered a new and specific role for *flbD* during sexual development. While *flbD*^{R47P} mutants retain partial function during conidiation, both $\Delta flbD$ and *flbD*^{R47P} mutants are unable to develop the peridium, a specialized external tissue that differentiates during fruiting body formation and ends up surrounding the sexual spores. This function, unique among other *fluffy* genes, does not affect the viability of the naked ascospores produced by mutant strains. Notably, ascospore development in these mutants is still dependent on the NADPH oxidase NoxA. We generated R47K, C46D, C46S, and C46A mutant alleles and evaluated their effects on asexual and sexual development. Conidiation defects were most severe in $\Delta flbD$ mutants and stronger in R47P, C46D, and C46S strains than in R47K strains. In contrast, mutants carrying the *flbD*^{C46A} allele exhibited conidiation defects in liquid culture only under nitrogen starvation conditions. The R47K, R47P, C46D, and C46S mutants failed to develop any peridial tissue, while the *flbD*^{C46A} strain showed normal peridium development and increased cleistothecium formation. Our results show that FlbD regulates both asexual and sexual differentiation, suggesting that both processes require FlbD DNA binding activity and that FlbD is involved in the response to nitrogen starvation.

All living organisms require sensing and integration of environmental signals in appropriate ways to generate responses that determine transitions between cell growth, programmed cell death, and differentiation. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is an excellent model for studying these processes, as it presents complex but defined cell cycle transitions between growth (mycelia) and asexual (conidiation) and sexual (cleistothecium and ascospore development) differentiation and is amenable to genetic analysis.

A. nidulans asexual reproduction is induced by environmental signals such as exposure to air (2, 70) or nutrient starvation (63). It involves the production of chemical signals (9, 25, 38, 40, 44, 64, 72) and depends on activation of the *brlA* gene (10), which encodes a transcription factor (TF) of the Zn finger family (1, 29, 48, 54). Normally, conidiation involves the production of a mycelial cell compartment, from which a conidiophore stalk develops. After the stalk reaches a determined length, polar growth stops for development of a multinucleated vesicle, from which two successive uninucleate cell types are produced by budding (metulae and phialides). The phialides are conidiogenic cells that produce uninucleate spores through several rounds of consecutive mitosis (reviewed in references 2, 5, 16, and 81).

fluffy mutants, which show a cotton-like morphology and a notable delay in asexual development, were proposed to define genes upstream of *brlA* that are required for conidiation (13, 64, 68, 77). Indeed, extensive genetic analysis led to the identification of developmental regulators acting upstream of *brlA* (*fluG* and *flbA* to *-E* [*flbA-E*] genes) and required for its proper expression (77). FlbA is a regulator of a heterotrimeric G protein signaling pathway that stimulates vegetative growth and inhibits conidiation (83). In contrast, FluG is responsible for the production of an

extracellular signaling factor required for activation of the *flbD-E* genes in vegetative cells and to induce conidiation, along with other unidentified compounds (38, 39, 44, 56, 64). FlbB is a TF of the bZIP type that unexpectedly also localizes at the hyphal tips of vegetative hyphae, forming a complex with FlbE (17, 18, 21). *flbE* encodes a small protein with two conserved but uncharacterized domains, and FlbE and FlbB are functionally interdependent and proposed to regulate the transition from vegetative growth to conidiation (20, 34). FlbB is found in nuclei, but notably, it is detected only at the most apical nucleus in vegetative hyphae (18). *flbD* encodes a TF of the Myb family (76) which, together with FlbB, is required to jointly activate *brlA* expression and conidiation (21). FlbC is a zinc finger TF that binds the *brlA* promoter *in vitro*, and the highest expression level of *flbC* correlates with cessation of apical extension and swelling of the conidiophore vesicle, which are phenotypes also observed for *flbC* overexpression (33). Two other mutants with delayed asexual development defined the *tmpA* and *fluF* genes. *tmpA* encodes a flavoenzyme required for the production of a sporulation chemical signal independent of the FluG factor (64). A *fluF1* mutant was isolated after treatment with 5-azacytidine (68), but the identity of the gene remained unknown.

Received 27 March 2012 Accepted 6 July 2012

Published ahead of print 13 July 2012

Address correspondence to Jesús Aguirre, jaguirre@ifc.unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://ec.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/EC.00101-12

Frequently, sexual development (formation of fruiting bodies containing ascospores) occurs after conidiation, usually under low-nutrient and oxygen limitation conditions and in the absence of light (9). The first sign of sexual development is the formation of Hülle cells, which later surround the mature fruiting body, or cleistothecium. Cleistothecium formation involves the differentiation of a central ascogenous tissue that gives rise to asci and ascospores and the development of a network of sterile hyphae surrounding the ascogenous tissue, which finally develops into a melanized cleistothecial wall, or peridium (9, 62). Signaling involved in initiation of fruiting body development is mediated by membrane-bound G-protein-coupled receptors (GprA, GprB, and GprD) (23, 61). Besides signaling through the G protein (FadA, SfaD, and GpgA) (57, 61, 83), the mitogen-activated protein kinase (MAPK) module SakA-AtfA (31, 36), the COP9 signalosome (7), VeA (5, 32, 65, 81), and several transcription factors, including SteA (73), NsdD (23), StuA (47), CpcB (27), and NosA (75), are required for or regulate fruiting body formation. However, the target genes of these TFs are mostly unknown. The *noxA* gene, encoding an NADPH oxidase, is also essential for sexual differentiation. Null *noxA* mutants are blocked at a very early stage (primordia) of cleistothecium formation and fail to produce mature cleistothecia and ascospores (35), whereas in *Neurospora crassa* (8) and *Podospira anserina* (42), the elimination of the NADPH oxidase NOX-1 results in complete female sterility, indicating that NOX-generated reactive oxygen species (ROS) play important roles in cell differentiation.

How ROS signaling triggers differentiation remains a key question. However, several proteins, including protein tyrosine phosphatases and transcription factors, have been shown to be targets for oxidation by ROS (11, 74). TFs of the Myb family are found in animals, plants, fungi, protozoa, and algae (14, 45, 51, 58, 66, 76). These proteins play important roles in various cellular processes, such as cell proliferation, apoptosis, differentiation, metabolism, and environmental sensing. Myb TFs are regulated by various mechanisms, one of which involves redox regulation of an invariant cysteine residue whose reduction is essential for DNA binding (49).

Here we show that *fluF* and *flbD* are the same gene and that the *fluF1* allele corresponds to a point mutation that results in an R47P replacement within the FlbD Myb domain. Furthermore, we report a new and specific role for *flbD* in sexual development by showing that *flbD* mutants fail to produce the cleistothecial peridium but nevertheless develop viable “naked” ascospores. Analyses of different *flbD* mutant alleles indicate that FlbD plays different roles in asexual and sexual development, depending on DNA binding activity, perhaps involving redox regulation of conserved Myb domain C46.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, and growth conditions. Strains used in this work are listed in Table 1. For *flbD* analysis, we used a strain carrying a truncated allele that would result in a FlbD protein lacking its C terminus (76), referred to here as *flbD1*. The *flbC8* allele contains a point mutation that produces an H237Q change in the second putative zinc finger, consistent with a loss of function (46). The *flbB* allele, originally isolated as *fluH1* (69), corresponds to a point mutation changing codon 57 into a stop codon (AAG to TAG) that results in a truncated peptide (this work). *flbE58* has not been sequenced yet but very likely corresponds to a loss-of-function allele (77). Δ *flbD* strains in a *veA*⁺ back-

ground were obtained from a cross between strains TJAQ15 and FG-SCA4. The presence of the *veA*⁺ allele was confirmed by PCR using genomic DNAs from selected progeny and the primers *veA*⁺ forward and *veA*⁺ reverse, with digestion of the PCR product with the BstXI enzyme (NEB, Ipswich, MA), as reported previously (24). All strains were grown at 37°C in glucose-supplemented minimal nitrate medium (26). Genetic manipulations, including diploid formation, were performed according to the methods of Pontecorvo et al. (53). Asexual developmental cultures and nutrient starvation were carried out as reported previously (3, 63). To induce sexual development in confluent plates, conidia from 5 days of growth were plated on top agar at 1×10^5 conidia per plate, incubated at 37°C for 24 h (0-h time point), and then sealed with masking tape. To induce sexual development in point-inoculated plates, spores were inoculated on water-agar plus supplements (no carbon or nitrogen source) and grown at 37°C for 5 days, 4 small agar cylinders of synthetic crossing medium for *Neurospora crassa* (6) were then placed symmetrically on the border of the colony, and the plate was sealed with masking tape and incubated at 37°C for 7 to 10 days.

Disruption of *flbD*, *flbD* point mutations, and GFP tagging. Genomic DNA was used as the template to produce an *flbD* gene replacement construct by double-joint PCR (82). The 5' *flbD* fragment was obtained with primers 5FORflbD and 5REV+TAILflbD (see Table 2 for primer sequences). The 3' *flbD* fragment was amplified with primers 3FOR+TAILflbD and 3REVflbD. An *Aspergillus fumigatus pyrG* marker was amplified with primers pyrGforward and pyrGreverse, using plasmid pFNO3 (50) as the template. The three fragments were purified, mixed, and used in a fusion PCR with primers FORnestedflbD and RevnestedflbD. The final, 4,000-bp *flbD*-*Afp**pyrG*-*flbD* cassette was purified and used to transform *A. nidulans* strain CFL3 by conidium electroporation (59). Point mutations in C46 and R47 in the FlbD Myb domain were introduced by overlap extension PCR. A 5' *flbD* fragment including the mutation was amplified with primers MutForflbD and RevflbD(C-D), RevflbD(C-S), RevflbD(C-A), or RevflbD(R-K). A 3' *flbD* fragment including the mutation was amplified with primers MutRevflbD and ForflbD(C-D), ForflbD(C-S), ForflbD(C-A), or ForflbD(R-K). These fragments were combined in overlap extension reaction mixtures with primers ForflbDpENTER and RevflbDpENTERS/stop to clone these PCR fragments as reported previously (71), placing the *flbD* open reading frame (ORF) (wild-type or mutant alleles) under the control of the *alcA* promoter and tagging the FlbD C terminus with monomeric red fluorescent protein (mRFP). To obtain the *flbD*^{R47P} allele, the *flbD* ORF was amplified with the primers ForflbDpENTER and RevflbDpENTERS/stop, using genomic DNA from the *fluF1* mutant as the template. Plasmids obtained in this way were designated pFlbDwtENTR, pFlbDC46DENTR, pFlbDC46SENTR, pFlbDC46AENTR, pFlbDR47KENTR, and pFlbDR47PENTR. After confirming the *flbD* ORF sequence in each plasmid, the pFlbDENTR plasmids were used for recombination with the destination vector pMT-mRFP (71), using Gateway LR Clonase enzyme mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) as indicated by the manufacturer. The resulting plasmids, palca-*flbD*-mRFP plasmids (pJAQ9 to -14), were used to transform strain CJAQ25 by protoplast fusion. Three PCR products were used to generate an *flbD* C-terminal green fluorescent protein (GFP) wild-type or mutant construct according to the method of Yang et al. (79). First, a 5' fragment upstream of the stop codon, including the entire *flbD* ORF, was amplified with primers flbDGSP1 and flbDGSP2 (for the wild-type construct) or with primers flbDGSP1b and RevflbDpENTERS/stop, using palca-*flbD*-mRFP plasmids as the templates. Second, a 3' *flbD* fragment was amplified with primers flbDGSP3 and flbDGSP4. Third, the GFP gene and the *A. fumigatus pyrG* marker were amplified with primers flbDGFP1 and flbDGFP2, using plasmid pFNO3 as the template (50). Purified fragments were mixed and used in a fusion PCR with primers flbDGSP4 and flbDGSP1 or flbDGSP1b. The 4,630-bp *flbD*-*gfp*-*Afp**pyrG* cassette was used to transform *A. nidulans* strain A1155 by conidium electroporation or protoplast fusion (59, 60, 80).

TABLE 1 *Aspergillus nidulans* strains used in this work

Strain	Genotype	Source or reference
CLK43	<i>pabaA1 yA2; veA1</i>	31
CFL3	<i>pabaA1 yA2; pyrG89; veA1</i>	36
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	FGSC
FGSCA4	<i>biA1</i>	FGSC
PW-1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	FGSC
A1155	<i>pyrG89; pyroA4 ΔnkuA::bar; veA1</i>	M. Hynes; 50
RJF009	<i>biA1; metG1; veA1 flbC8</i>	J. Fondon and T. Adams
RJW120	<i>yA2 flbE58 metG1 veA1</i>	77
TJW30.1	<i>pabaA1 yA2; flbD::trpC trpC801 veA1</i>	76
CJA16	<i>biA1; metG1; brlA::lacZ ΔflbB; veA1</i>	3
G1059A3	<i>adF17 pabaA1 yA2; fluF1 veA1</i>	M. Tamame
CAF2	<i>yA2; pyrG89; fluF1 veA1</i>	This work; progeny from G1059A3 × CS2902 cross
CS2902	<i>pyrG89 riboB2 pyroA4 biA1 veA1</i>	C. Scazzocchio
TGS6	<i>pabaA1 yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801 ΔtmpA::argB veA1</i>	64
TAH1	<i>pyrG89; pyroA4 ΔnkuA::bar; ΔnoxA::AfpYrG; veA1</i>	A. Hernández; A1155 transformed with <i>noxA-AfpYrG-noxA</i> PCR construct
CAH4	<i>pabaA1 yA2; ΔnoxA::AfpYrG; VeA1</i>	A. Hernández; progeny from TJAQ15 × TAH1 cross
CJAQ8	<i>biA1; fluF1 veA1</i>	This work; progeny from CAF2 × FGSC26 cross
CJAQ10	Diploid CAF2/TJW30.1	This work
CJAQ18	Diploid FGSC26/TJW30.1	This work
CJAQ21	Diploid PW-1/G1059A3	This work
CJAQ24	<i>pabaA1 yA2; fluF1 veA1</i>	This work; progeny from G1059A3 × FGSC26 cross
CJAQ25	<i>pabaA1 yA2; argB2; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; progeny from TJAQ15 × PW-1 cross
CJAQ40	<i>pabaA1 yA2; ΔnoxA::AfpYrG; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; progeny from TJAQ15 × TAH1 cross
CJAQ51	<i>pyroA4; veA1</i>	This work; progeny from TJAQ15 × GR5 cross
CJAQ52	<i>pyroA4; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; progeny from TJAQ15 × GR5 cross
TJAQ15	<i>pabaA1 yA2 pyrG89; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CFL3 transformed with <i>flbD-AfpYrG-flbD</i> PCR construct
TJAQ20	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{wr}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ9
TJAQ24	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{R47P}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ14
TJAQ30	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{R47K}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ13
TJAQ35	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{C46D}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ10
TJAQ41	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{C46S}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ11
TJAQ46	<i>pabaA1 yA2; alcAp::flbD^{C46A}::mRFP::argB; ΔflbD::AfpYrG veA1</i>	This work; CJAQ25 transformed with plasmid pJAQ12
TJAQ48	<i>pyrG89; pyroA4; flbD::gfp::AfpYrG veA1</i>	This work; A1155 transformed with construct <i>flbD-GFP-AfpYrG</i>
TJAQ49	<i>pyrG89; pyroA4; flbD^{R47P}::gfp::AfpYrG veA1</i>	This work; A1155 transformed with <i>flbD^{R47P}-GFP-AfpYrG</i> construct
TJAQ50	<i>pyrG89; pyroA4; flbD^{C46D}::gfp::AfpYrG veA1</i>	This work; A1155 transformed with <i>flbD^{C46D}-GFP-AfpYrG</i> construct
TJAQ51	<i>pyrG89; pyroA4; flbD^{C46A}::gfp::AfpYrG veA1</i>	This work; A1155 transformed with <i>flbD^{C46A}-GFP-AfpYrG</i> construct
COS400	<i>pabaA1 yA2; ΔflbD::AfpYrG</i>	This work; progeny from TJAQ15 × FGSCA4 cross

Transformants with point mutations were confirmed by Southern blot analysis and DNA sequencing.

RNA extraction and Northern blot analysis. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use, at which time they were ground with a mortar and pestle under liquid nitrogen. Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Ten to 15 μg of RNA was separated in a 1% agarose gel containing formaldehyde, transferred to a Hybond N+ membrane, and hybridized using specific probes.

RESULTS

***fluF1* is an *flbD* allele.** A *fluffy* mutant isolated after treatment with 5-azacytidine defined the *fluF1* gene, which was assigned to chromosome VIII (68). *fluF1* is located in the standard genetic map of *A. nidulans* as the most centromere-proximal identified locus in the long arm of chromosome VIII (<http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/viiimap.html>). This location is based on its reported close linkage (4 centimorgans [cM]) with *choC*. However, in the same article, a linkage of 6.5 cM is reported for another marker, *fwA1*, which is not linked to *choC* (67) in the standard map. We confirmed by mitotic haploidization the location of *fluF1* in chro-

somosome VIII; however, we failed to detect any linkage with *choC* (identifiable as ANID_1376) (<http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/viiicontigs.html>; our unpublished observations) or with *sonA* (ANID_1379) (78), which is centromere proximal to *choC*. We thus investigated whether *fluF1* is allelic with other mutations in chromosome VIII that result in a *fluffy* phenotype. To identify the affected gene, we carried out complementation tests on diploids with mutations in other genes located in chromosome VIII whose mutation results in a *fluffy* phenotype map (*flbD* [76] and *tmpA* [64]). Diploid strains obtained by crosses between *fluF1* mutants and wild-type (Fig. 1A) or $\Delta tmpA$ (not shown) strains showed wild-type conidiation. In contrast, diploids obtained by crosses between *fluF1* and *flbD1* mutants maintained a *fluffy* phenotype, indicating that *fluF1* and *flbD1* are alleles (Fig. 1A). Standard genetic crosses between *fluF1* and *flbD1* strains failed to yield wild-type recombinants among 329 progeny analyzed (Fig. 1B), confirming the allelism of *fluF1* and *flbD1*. We used *fluF1* strain genomic DNA as the template to amplify the cognate *flbD* gene. Direct sequencing of two independent PCR products showed a single G-to-C substitution in codon 47 (CGG \rightarrow CCG), which

TABLE 2 DNA primers used in this work

Primer name	Sequence
ForflbD	TTG AGT GGA ACA GAA TGC
RevflbD (GSP4)	TGG TCA CGC TCG ATA AGC
flbDf1seq (GSP1)	TTC ATC GCT CTC TGA CTC
flbDf2seq	CAA ACC GTC ACT AAA CCG
flbDr1seq	GGA CAA AAC GCT ACA ACC
SeqflbD	CCA TTT CGT TGA CCA TCC
f3flbDseq	ATC TAC ACA CTT CCT GC
r3flbDseq	TCT GTC GTA GGA GAC G
5FORflbD	TTG AGT GGA ACA GAA TGC
5REV+TAILflbD	AAG AGG GTG AAG AGC ATT GTT TGA GGC CTG TGT TGG TGA TGG AGG
3FOR+TAILflbD	ATC ACG CAT CAG TGC CTC CTC TCA GAC ATC ACA CGA CTC TCT TCC
3REVflbD	AAG CAA TCT CAA CGC AGC
pyrGforward	GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG
pyrGreverse	GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG C
FORnestedflbD	CTG GTC TTA CCG CTT CG
REVNestedflbD	CCT ACC TGA GTG CAA GG
flbDGSP1b	ATG GCT CCA ACA CA
flbDGSP2	GTT CAA GAG GTT GTC GAG GCC CAT CCG
flbDGSP3	ACG ATC ACA CGA CTC TCT TCC TCC CG
flbDGFP1	CGG ATG GGC CTC GAC AAC CTC TTG AAC GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG
flbDGFP2	CGG GAG GAA GAG AGT CGT GTG ATC GTG TCT GAG AGG AGG CAC TGA TGC
MutForflbD	CAT TCT TCA CCT CAA CG
MutRevflbD	GAA AAG CGA GAG ACT GAG G
ForflbD(C-D)	CAA GCA AGA TCG GGA ACG
RevflbD(C-D)	GTT CCC GAT CTT GCT TGG
ForflbD(C-S)	CAA GCA ATC TCG GGA ACG
RevflbD(C-S)	GTT CCC GAG ATT GCT TGG
ForflbD(C-A)	CAA GCA AGC TCG GGA ACG
RevflbD(C-A)	GTT CCC GAG CTT GCT TGG
ForflbD(R-K)	GCA ATG CAA GGA ACG TTA CC
RevflbD(R-K)	GGT AAC GTT CCT TGC ATT GC
ForflbDpENTER	CAC CAT GGC TCC AAC ACA CC
RevflbDpENTERstop	TCA GTT CAA GAG GTT GTC G
RevflbDpENTERS/stop	GTT CAA GAG GTT GTC GAG G
veA ⁺ forward	AGC CCA TCC AGC CCA TCT
veA ⁺ reverse	TCT CCG CGC CGT CTC ATC

results in replacement of the highly conserved arginine 47 by proline (R47P) in the FlbD protein (Fig. 1D; see Fig. S1 in the supplemental material).

Comparison of different alleles identifies a new role for *flbD* during sexual development. To determine the phenotype of a null *flbD* mutant, we deleted the entire *flbD* coding region by using the deletion construct 5'flbD-AfpYrG-3'flbD (see Fig. S2A in the supplemental material), generated by double-joint PCR, and used it to transform electrocompetent conidia from an *A. nidulans* CFL3 strain. Eight *fluffy* PyrG⁺ transformants analyzed by Southern blotting had the correct gene deletion event (see Fig. S2A and B). When conidiation levels of wild-type, *flbD*^{R47P} (*fluF1*), *flbD1*, and Δ *flbD* strains were compared, we found that although all strains carrying *flbD* mutant alleles were strikingly impaired in conidiation, this phenotype was more severe in Δ *flbD* strains (Fig. 2A). As *flbD* mRNA levels were not affected in the *flbD*^{R47P} mutant (see Fig. S3), our results suggest that *flbD*^{R47P} and *flbD1* alleles produce proteins with partial function in the regulation of asexual sporulation.

In performing sexual crosses between *flbD1* and *flbD*^{R47P} (*fluF1*) strains, we noticed that it was very difficult to detect and isolate cleistothecia, as putative fruiting bodies appeared very soft and wet. To follow sexual development more closely in isolated fruiting bodies, we successfully adapted a method developed for *Neurospora crassa* (6, 12). Under these conditions, we observed that all *flbD* mutants produced atypical fruiting structures (Fig. 2B), characterized by the presence of many Hülle cells and naked ascospores, which lacked the external tissue (peridium) that normally surrounds and protects the ascospores (9, 62). Ascospores produced in this way presented normal viability (not shown), and their production was denoted by the deposition of a reddish purple pigment on the plate surface (Fig. 2B). Having shown previously that the NADPH oxidase NoxA is required for the production of ROS at the peridial tissue and for cleistothecium development (35), we asked if the NoxA requirement could be bypassed in *flbD* mutants, which can develop ascospores in the absence of peridial tissue. We generated Δ *flbD* Δ *noxA* double mutants and followed sexual development as described before. As shown in Fig. 2C, a Δ *flbD* Δ *noxA* double mutant was arrested at a very early stage of development (initial cleistothecia) and, similarly to a Δ *noxA* single mutant, was unable to produce any ascospores. These results demonstrate that peridium and ascospore development represents two separable developmental processes and that in addition to its role in asexual development, *flbD* is required for peridium formation during sexual development but dispensable for ascospore production, while the absence of NoxA results in a blockage of sexual development at a very early stage and prevents both developmental outcomes.

***flbD*, but not other *fluffy* genes, has a *veA*-independent role in sexual development.** As indicated before, inactivation of the *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*, and *tmpA* genes results in *fluffy* phenotypes related to a delay in asexual development and less expression of the *brlA* gene (*fluffy* low *brlA*) (64, 77). Furthermore, FlbB and FlbD act together to regulate asexual sporulation as well as polarized growth (21). We therefore asked if these or other types of *fluffy* gene interactions were also required for peridium development or general sexual differentiation. In contrast to the Δ *flbD* mutant, *flbB*, *flbC*, *flbE*, and *tmpA* mutants were all able to differentiate normal fruiting bodies (Fig. 3), which produced normal and viable ascospores like those of a wild-type strain. These results indicate that FlbD's role in peridium development is specific and independent of the FlbD partner FlbB and the *flbC*, *flbE*, and *tmpA* genes.

The *A. nidulans* *veA* gene encodes a 573-amino-acid protein required for cleistothecium formation (32). Because our laboratory strains contain a defective *veA1* allele that results in more production of conidia and smaller numbers of cleistothecia (30), we also evaluated the *flbD* mutant's sexual phenotype in the presence of a wild-type *veA* allele. As shown in Fig. S4 in the supplemental material, a Δ *flbD* *veA*⁺ strain developed fruiting structures which also lacked the peridium and produced naked ascospores, indicating that FlbD's role in peridium development is independent of the *veA* gene.

FlbD Myb domain residue C46 plays critical roles in both asexual and sexual development. Many reports indicate that Myb transcription factors can be regulated by redox modification. This mechanism involves a cysteine conserved in all R1R2R3 and R2R3 Myb family members from plants, fungi, and animals (see Fig. S1 in the supplemental material). This cysteine can act as a redox

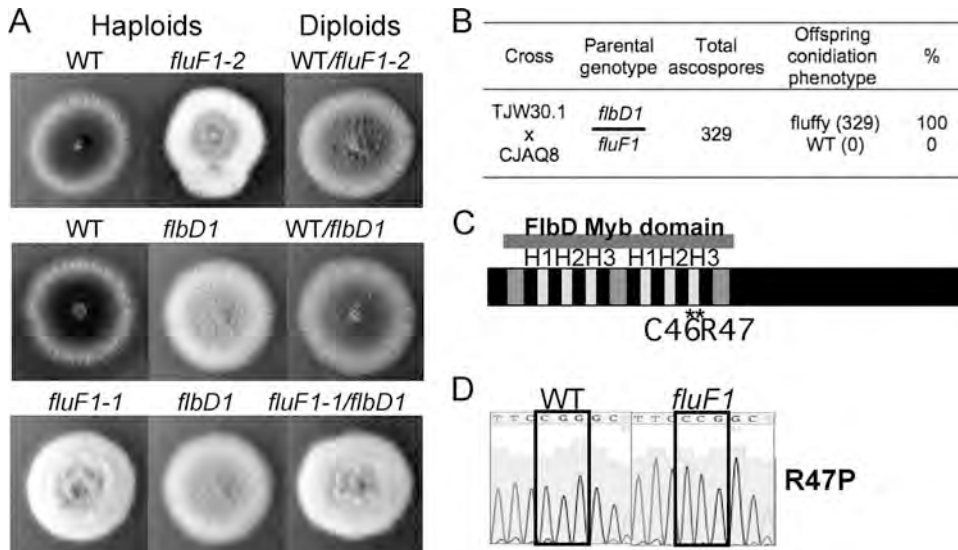


FIG 1 *fluF1* is an *flbD* allele in which arginine 46 codon CCG is replaced by proline codon CCG. (A) A diploid between *fluF1-1* and *flbD1* *fluffy* gene mutants shows a *fluffy* mutant phenotype. Strains FGSC26 (WT; top panel), PW-1 (WT; middle panel), CAF2 (*fluF1-1*), G1059A3 (*fluF1-2*), TJW30.1 (*flbD1*), CJAQ10 (*fluF1-1/flbD1*), CJAQ18 (WT/*flbD1*), and CJAQ21 (WT/*fluF1-2*) were point inoculated onto supplemented minimal medium (MM) plates and incubated at 37°C for 3 days. (B) *fluF1* (CJAQ8) and *flbD1* (TJW30.1) strains show very little recombination in sexual crosses. Ascospores from a hybrid cleistothecium were inoculated onto supplemented MM plates containing yeast extract and incubated at 37°C for 3 days, and then the *fluffy* phenotype was scored. (C) FlbD, a transcription factor of the Myb domain family, contains two repeats with three alpha helices, indicated as H1 to H3. The second repeat contains the highly conserved amino acids cysteine (C46) and arginine (R47). (D) *fluF1* mutation results in replacement of arginine 47 by proline (R47P). Genomic DNAs from wild-type (CLK43) and *fluF1* mutant (G1059A3) strains were amplified by PCR and sequenced as shown in the pherogram. See Table 1 for full strain genotypes.

sensor, and in fact, its oxidation impairs DNA binding *in vitro* (49). Adjacent to this cysteine in these Myb proteins is a highly conserved arginine residue whose positive charge affects cysteine’s pK_a and therefore its redox properties (11). In FlbD, these residues correspond to C46 and R47, and the fact that the R47P substitution results in a virtually complete lack of function (Fig. 4 and 5) suggests that this change might affect C46’s redox properties. However, the role of C46 in FlbD’s function has not been evaluated. To test this, we generated mutant alleles with mutations in C46 and R47. C46D and C46S changes were expected to impair DNA binding (22, 49), while a C46A change was expected to improve or not affect DNA binding (49). R47 was replaced by K, also a positively charged residue, with the expectation that this should not affect FlbD function, as in some Myb proteins from *Entamoeba histolytica* the residue next to C corresponds to K (45). We fused wild-type and mutant alleles to the reporter gene *mRFP* and placed the construct under the control of the inducible alcohol dehydrogenase gene (*alcA*) promoter (71). Plasmids were used to transform the $\Delta flbD$ strain CJAQ25, directing the integration to the *argB* locus (for details, see Materials and Methods). Integration into *argB* was confirmed via Southern blotting (see Fig. S5 in the supplemental material), and each *flbD* point mutation was confirmed by DNA sequencing using genomic DNA as the template (not shown).

The results in Fig. 4A and B show that on solid medium, wild-type *flbD* fused to the *mRFP* allele complemented the conidiation defects of the $\Delta flbD$ strain, even in the presence of glucose on the plate, a condition in which *alcA* is known to be expressed weakly (43). However, the mRFP tag was not useful to localize FlbD::mRFP, as its signal was undetectable by fluorescence microscopy under growth, asexual or sexual differentiation, or even inducing (ethanol or threonine) conditions. Under the same conditions,

the expression of the *flbD*^{R47P} and *flbD*^{C46D} alleles resulted in only a modest increase in conidiation. The *flbD*^{R47K} allele showed improved conidiation in comparison to the *flbD*^{R47P} allele, but without reaching wild-type levels. This indicates that a positive charge at position 47 is important for FlbD function in conidiation but that K is not functionally equivalent to R in FlbD. Strains carrying an *flbD*^{C46S} allele showed about half of wild-type conidiation levels, similar to the level exhibited by the *flbD*^{R47K} strain. Notably, the *flbD*^{C46A} allele resulted in conidiation levels that were indistinguishable from those found in the wild type, consistent with the expectation that a C46A change should improve or not affect FlbD DNA binding (49). These results highlight the regulatory role of C46 in FlbD during conidiation.

To test the functionality of these *flbD* alleles during sexual differentiation, we evaluated the strain phenotypes by using a standard assay for inducing sexual development in which conidiation occurs first and is then followed by fruiting body development. The results in Fig. S6 in the supplemental material show that under these conditions, *alcA*-driven expression of wild-type and *flbD*^{C46A} alleles was also enough for conidiation (see conidiophores and yellow conidia) but not enough to rescue normal sexual development (note that water droplets were formed around clumps of naked ascospores).

As an alternative approach to evaluate the effects of point mutations within the FlbD Myb domain on sexual development, we generated a new set of constructs to express wild-type and mutant alleles fused to GFP from the endogenous *flbD* promoter. These constructs were used to transform *A. nidulans* strain A1155 (*nkuA*), and integration was directed to the *flbD* locus. Each point mutation was confirmed by DNA sequence analysis of the entire *flbD* ORF (data not shown). The results in Fig. 5A show that strains containing wild-type and *flbD*^{C46A} alleles showed wild-type

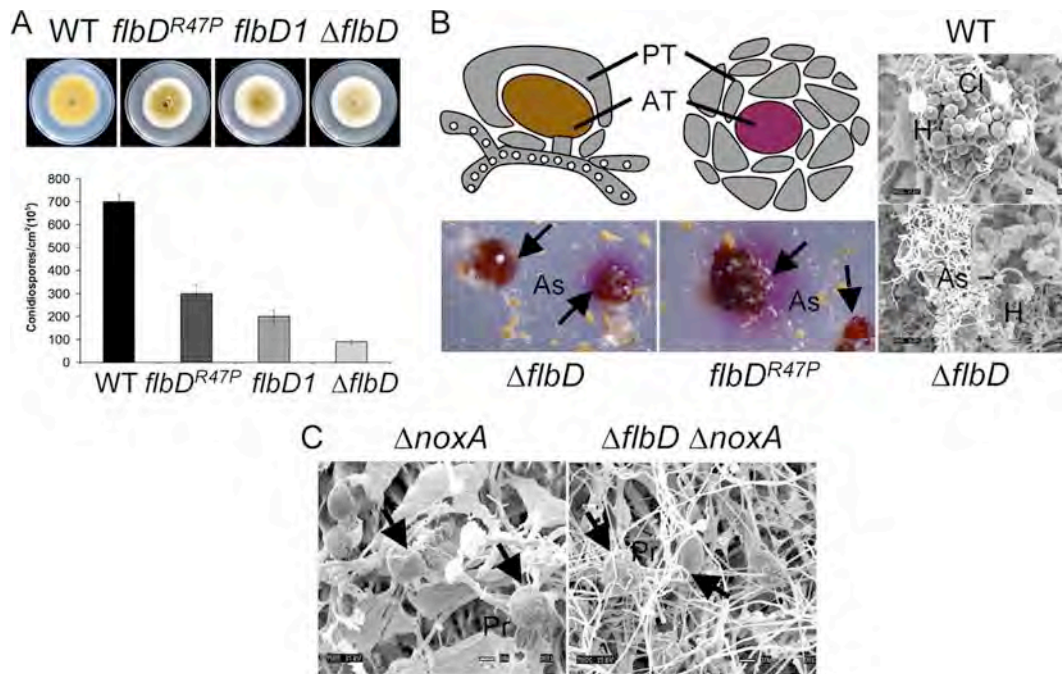


FIG 2 *flbD* is required for peridium but not *noxA*-dependent ascospore development during sexual differentiation. (A) Strains CLK43 (WT), CJAQ24 (*fluF1*; referred to as *flbD^{R47P}*), TJW30.1 (*flbD1*), and TJAQ15 ($\Delta flbD$) were point inoculated onto supplemented MM plates and incubated at 37°C for 5 days. Total conidiospores were harvested and counted for each colony. Error bars indicate standard deviations for three independent experiments. (B) Schematic representation of early stages of cleistothecium development (upper left). Strains TJAQ15 ($\Delta flbD$) and CJAQ24 (*fluF1*; referred as *flbD^{R47P}*) were induced to undergo sexual development by use of a method adapted from an *N. crassa* method (see Materials and Methods), and samples were observed using a stereoscopic microscope (magnification, $\times 8$) after 7 days of development (lower left) or processed for scanning electron microscopy after 8 days of development (right panels). Red aggregates of ascospores lacking the surrounding peridial tissue are indicated with black arrows. Scanning electron micrographs show a wild-type cleistothecium and $\Delta flbD$ ascospore aggregates next to some filamentous cells (hyphae). (C) Strains CAH4 ($\Delta noxA$) and CJAQ40 ($\Delta flbD \Delta noxA$) were grown as described above. Images were taken after 8 days of sexual development by use of scanning electron microscopy. For scanning electron microscopy images, white bars indicate the magnification. PT, peridial tissue; AT, ascogonic tissue; As, ascospores; Cl, cleistothecia; H, Hülle cells; Pr, primordium. See Table 1 for full strain genotypes.

conidiation, indicating that the GFP tag did not affect FlbD's function under these conditions. However, the GFP fluorescence signal was not detectable during growth or asexual or sexual differentiation, likely due to low FlbD protein levels *in vivo*. *flbD^{C46D}*

and *flbD^{R47P}* strains showed delayed conidiation, again confirming the results in Fig. 4. Regarding sexual differentiation, *flbD^{C46D}* and *flbD^{R47P}* strains produced only naked ascospores without a peridium (Fig. 5B). In contrast, the *flbD^{C46A}* strain was able to

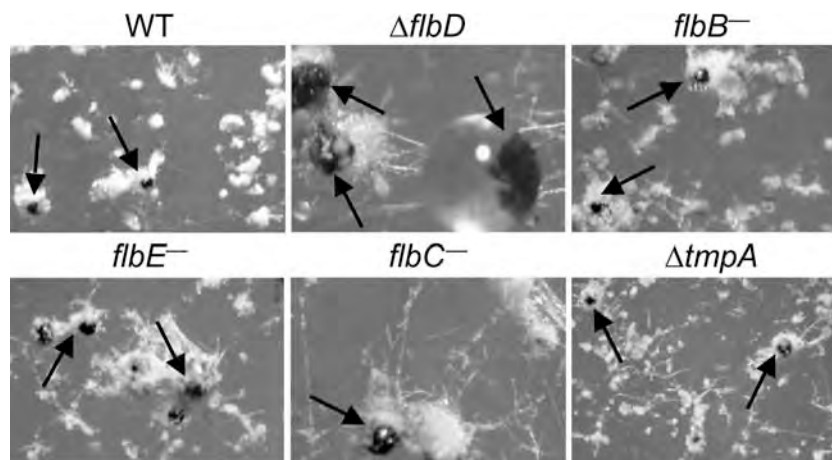


FIG 3 *flbD* is unique among other *fluffy* genes with regard to its specific role in sexual development. Strains CLK43 (WT), TJAQ15 ($\Delta flbD$), CJA16 (*flbB*), RJF009 (*flbC*), RJW120 (*flbE*), and TGS6 ($\Delta tmpA$) were point inoculated onto supplemented agar plates and incubated at 37°C for 5 days. Sexual induction was carried out as indicated. Images were taken with a stereoscopic microscope. Magnification, $\times 8$. Some heterogeneity in fruiting body size was observed in all strains. See Table 1 for full genotypes.

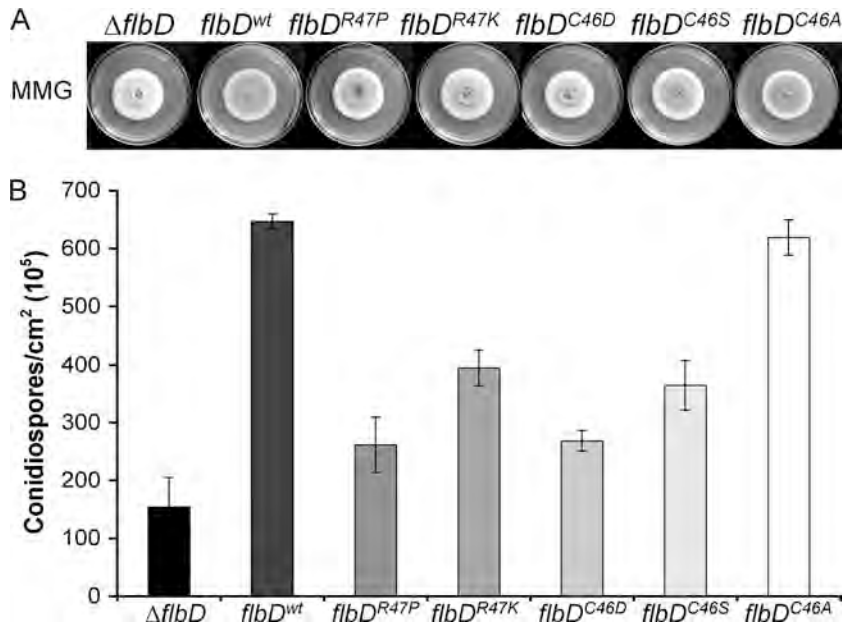


FIG 4 Asexual development of $\Delta flbD$ mutants carrying different *flbD* alleles, encoding proteins with amino acid substitutions at C46 and R47, in *trans*. Plasmids pJAQ9 to -14 (directed to the *argB* locus), containing wild-type or mutated *flbD* alleles (R47P, R47K, C46D, C46S, and C46A) expressed from the inducible *alcA* promoter and tagged with mRFP at the C terminus, were used to transform strain CJAQ25 ($\Delta flbD$). Strains TJAQ15 ($\Delta flbD$), TJAQ20 (*flbD*^{wt}), TJAQ24 (*flbD*^{R47P}), TJAQ30 (*flbD*^{R47K}), TJAQ35 (*flbD*^{C46D}), TJAQ41 (*flbD*^{C46S}), and TJAQ46 (*flbD*^{C46A}) were point inoculated onto glucose-supplemented MM plates and incubated at 37°C for 5 days. The total number of conidiospores per colony area was calculated. Error bars indicate standard deviations for three independent experiments.

differentiate fully developed fruiting bodies, which produced viable ascospores just like those of the wild-type strain, also showing that the GFP tag did not interfere with FlbD's function in sexual development. Moreover, the *flbD*^{C46A} strain produced larger numbers of cleistothecia than the wild-type strain, although the process occurred within the wild-type time frame (Fig. 5C). Our results indicate that amino acids C46 and R47 play an essential role in FlbD functions in both asexual and sexual differentiation and that for these roles, C46 can be replaced by A, which presumably does not affect FlbD binding to DNA.

We have previously shown that carbon starvation during liquid culture induces the differentiation of minimal conidiophores, while nitrogen starvation induces the formation of fully differentiated conidiophores (63). We found that under these conditions, *fluffy* mutants such as *tmpA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, and *flbE* mutants conidiated well under carbon starvation conditions but failed to conidiate under nitrogen starvation conditions (not shown). Having shown that the *flbD*^{C46A} allele is fully functional in asexual and sexual differentiation, we asked whether it was also functional for nitrogen starvation-induced conidiation. The results in Fig. 6 show that under nitrogen starvation conditions, the wild-type and *flbD::gfp* strains formed fully developed conidiophores, in sharp contrast to the $\Delta flbD$ and *flbD*^{C46A} mutants, which failed to differentiate any conidiophore structures. These results clearly indicate that the C46A mutant cannot replace wild-type FlbD regulation of conidiation induced by nitrogen starvation and that FlbD plays multiple roles during *A. nidulans* development.

DISCUSSION

In this report, we have shown that *fluF* is an allele of the *flbD* gene, whose only known role was to activate *brlA*, a gene essential for

asexual sporulation. Indeed, FlbD is a Myb TF whose expression depends on the bZIP TF FlbB, and both FlbD and FlbB are jointly required to activate *brlA* expression (21). In this study, we found that FlbD is also essential for the differentiation of the peridium, a tissue that constitutes the fruiting body external wall protecting the sexual spores. Furthermore, we showed that this role is specific for FlbD, as *fluffy* genes *flbB*, *flbC*, *flbE*, and *tmpA* are not required for peridium development. This is particularly important in the case of FlbB, as it indicates that in contrast to what occurs during conidiation, FlbB is not necessary for *flbD* expression during sexual differentiation, and that FlbD does not require interaction with FlbB to carry out its functions in peridial development.

Recently, it was found that when *fluffy* mutants affected in *flbC* or *flbE* were induced to undergo sexual development, they showed increased cleistothecium formation and decreased conidiation, suggesting that these genes repress sexual development and maintain the balance between asexual and sexual differentiation (33, 34). Whether or not this relates to FlbD's role in sexual development requires further investigation.

In the plant pathogen *Gibberella zeae*, the inactivation of MTY1, a different Myb transcription factor highly conserved in the ascomycetes, results in decreased female fertility and perithecial production and, in some cases, the production of immature ascospores (41). This suggests that different Myb transcription factors might be involved in different aspects of fungal sexual development. In plants, members of the Myb family regulate flavonoid biosynthesis, cell fate and identity, the cell cycle, and responses to biotic and abiotic stresses. In these roles, Myb TFs have been described as coactivators or positive regulators, sometimes carrying out partially redundant functions (15, 19, 37).

Myb TFs have been described as targets for redox regulation

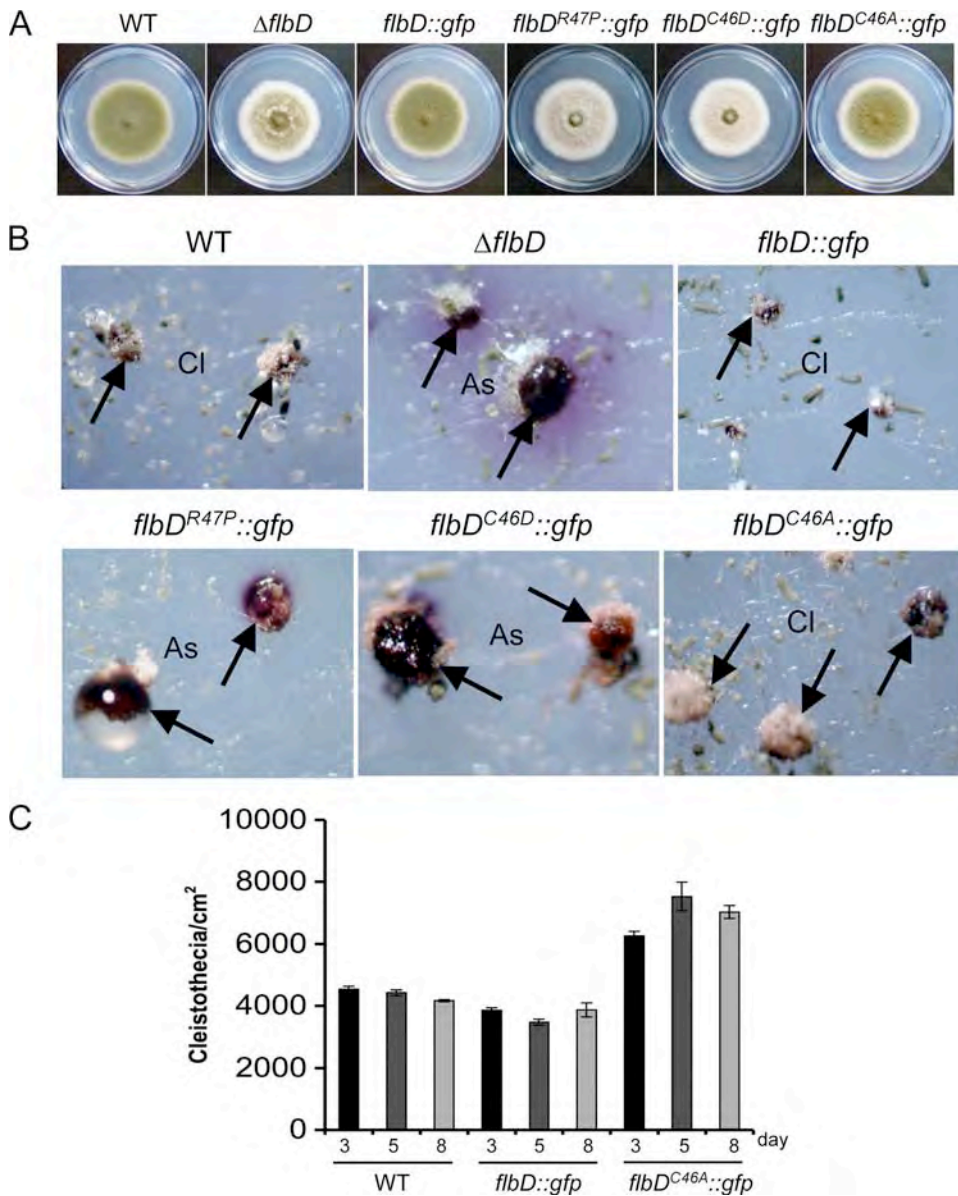


FIG 5 FlbD residues C46 and R47 in the Myb domain play critical roles in both asexual and sexual development. (A) Constructs containing wild-type or mutated (R47P, C46D, and C46A) *flbD* alleles, with the *A. fumigatus pyrG* gene as a selective marker and with C-terminal GFP tagging, were used to transform strain A1155 (*nkuA*). Strains CJAQ51 (WT), CJAQ52 ($\Delta flbD$), TJAQ48 (*flbD::gfp*), TJAQ49 (*flbD^{R47P}*), TJAQ50 (*flbD^{C46D}*), and TJAQ51 (*flbD^{C46A}*) were point inoculated onto glucose-supplemented MM plates and incubated at 37°C for 5 days. (B) The strains from panel A were point inoculated onto supplemented agar plates and incubated at 37°C for 5 days for sexual development. Images were taken by stereoscopic microscopy. Magnification, $\times 8$. (C) Conidia from strains CJAQ51 (WT), TJAQ48 (*flbD::gfp*), and TJAQ51 (*flbD^{C46A}::gfp*) were plated on top agar at 1×10^5 conidia/plate and incubated at 37°C. After 24 h, plates were sealed with Parafilm and samples were taken at the indicated times. The number of cleistothecia per square centimeter was calculated as reported previously (31). See Table 1 for full genotypes.

through reduction/oxidation of the cysteine C46 conserved in FlbD and in many other R1R2R3 and R2R3 family members from plants, fungi, and animals. In fact, the oxidation of this cysteine impairs DNA binding *in vitro*. Our results show that in FlbD, C46S and C46D substitutions impair function during asexual and sexual development. In contrast, a C46A substitution resulted in wild-type conidiation and fully developed fruiting bodies. Presumably, FlbD^{C46A} can bind its DNA targets constitutively or with wild-type affinity (Fig. 4A and B and 5), as the same replacement in the Myb TF Bas1p resulted in a functional TF *in vitro* and *in vivo*

(22, 49, 52). Since *flbB* is necessary to express *flbD* during conidiation but not during sexual development, putative constitutive DNA binding by FlbD^{C46A} would not interfere with FlbD's normal function during conidiation but could explain the larger numbers of fully differentiated fruiting bodies than those of a wild-type strain.

ROS produced by the NADPH oxidase NoxA are required for fruiting body development in *A. nidulans* and other fungi (4, 8, 35, 42). $\Delta noxA$ and $\Delta flbD \Delta noxA$ mutants were arrested at a similar early stage of development (cleistothecia initial) (Fig. 2C). This

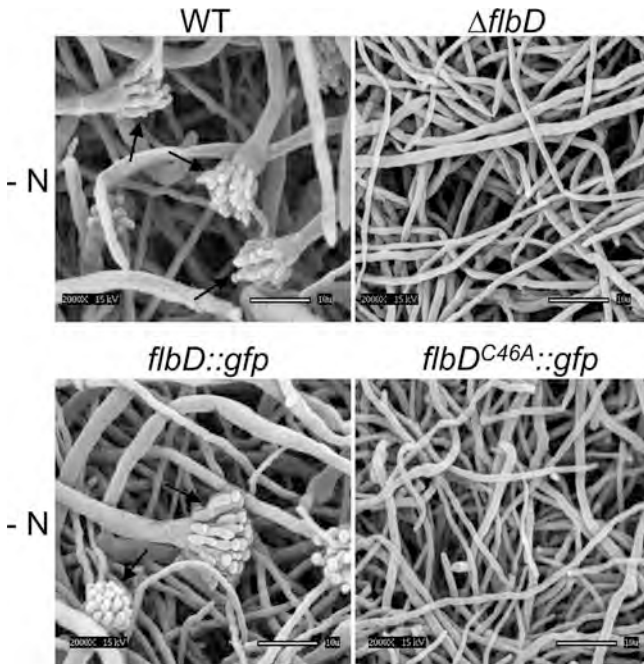


FIG 6 *flbD*^{C46A} strains are impaired in conidiation induced by nitrogen starvation. Mycelia from strains CJAQ51 (wild type), CJAQ52 ($\Delta flbD$), TJAQ48 (*flbD::gfp*), and TJAQ51 (*flbD*^{C46A}::*gfp*) grown for 18 h in liquid culture were shifted to the same medium lacking nitrate (–N). After 15 h, samples were fixed and processed for scanning electron microscopy. White bars indicate the magnification.

indicates that ROS are required for both peridium and ascospore development and that these stages are separable differentiation processes, with FlbD playing a role only in peridium formation. Although *flbD* mRNA levels were very low during sexual development, slightly increased levels were detected at the time of cleistothecium production (not shown). This and the fact that *alcA*-driven expression of *flbD* was enough for normal conidiation but not for peridium differentiation under conditions of drastically reduced expression (see Fig. S6 in the supplemental material) suggest that high and/or localized *flbD* mRNA levels are needed to develop the peridial tissue. Further research is needed to determine if localized NoxA-generated ROS can regulate FlbD function during sexual development.

Besides air contact, nutritional stress such as carbon or nitrogen starvation induces conidiation (63, 64). We have found that when *fluffy* mutants affected in the *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*, or *tmpA* gene (64) are starved for nitrogen, they fail to fully induce the *brlA* gene and to conidiate. Surprisingly, the *flbD*^{C46A} allele, which was fully functional in sexual differentiation and conidiation induced by an air interface, was not able to induce conidiation under nitrogen starvation conditions in submerged cultures. Under these conditions, FlbD might perform additional functions in nitrogen signaling or utilization. In *Schizosaccharomyces pombe*, the Myb-type DNA binding protein Reb1 regulates G₁ cell cycle arrest and sexual differentiation in response to nitrogen starvation (55), while in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* Cm-MYB1, an R2R3-type Myb TF activates expression of key nitrogen assimilation genes in response to nitrogen status (28).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants CB-2005-01-49667 and 153256 from CONACYT, by DFG-CONACYT Germany-Mexico collaboration grant 75306 from CONACYT, and by grant IN209211-2 from PAPIIT-UNAM. Jenny Arratia-Quijada was supported by a scholarship from CONACYT and DGEP-UNAM.

We thank Mercedes Tamame for helpful discussions and for the original *fluF1* strain, Steve Osmani for a *ts* allele of *sonA*, and Adriana Hernández for a $\Delta noxA$ strain. We also thank the Molecular Biology and Microscopy Units of IFC-UNAM for technical support.

REFERENCES

- Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54:353–362.
- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. 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, Lambeth JD. 2010. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1342–1353.
- Bayram O, Braus GH. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:1–24.
- Bistis GN. 1983. Synchronous induction and development of ascogonia. *Neurospora Newsl.* 1983:14.
- Busch S, et al. 2007. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:8089–8094.
- Cano-Dominguez N, Alvarez-Delfin K, Hansberg W, Aguirre J. 2008. NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 7:1352–1361.
- Champe SP, Nagle DL, Yager LN. 1994. Sexual sporulation, p 429–454. In Martinelli SD, Kinghorn JR (ed), *Aspergillus: 50 years on*, vol 29. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Clutterbuck AJ. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317–327.
- D’Autreaux B, Toledano MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:813–824.
- Davis RH, et al. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* 17:79–143.
- Dorn DL. 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 66:267–279.
- Du H, et al. 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Mosc.)* 74:1–11.
- Dubos C, et al. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15:573–581.
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U. 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18:569–576.
- Etxebeste O, et al. 2009. The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 73:775–789.
- Etxebeste O, et al. 2008. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 7:38–48.
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E. 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 66:94–116.
- Garzia A, et al. 2009. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* 71:172–184.
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Ugalde U, Espeso EA. 2010. The concerted action of bZIP and cMyb transcription factors *FlbB* and *FlbD* induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 75:1314–1324.
- Guehmann S, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K. 1992. Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* 20:2279–2286.

23. Han KH, et al. 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 41:299–309.
24. Han KH, Park JS, Chae KS, Han DM. 2010. Simple identification of *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 48:885–887.
25. Herrero-García E, Garzia A, Cordobes S, Espeso EA, Ugalde U. 2011. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* 115:393–400.
26. Hill TW, Käfer E. 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet. Newsl.* 48:20–21.
27. Hoffmann B, Wanke C, Lapaglia SK, Braus GH. 2000. c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 37:28–41.
28. Imamura S, et al. 2009. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in Cyanidioschyzon merolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:12548–12553.
29. Johnstone IL, Hughes SG, Clutterbuck AJ. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4:1307–1311.
30. Kaefler E. 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:217–232.
31. Kawasaki L, Sanchez O, Shiozaki K, 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.
32. Kim H, et al. 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37:72–80.
33. Kwon NJ, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu JH. 2010. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 77:1203–1219.
34. Kwon NJ, Shin KS, Yu JH. 2010. Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47:981–993.
35. Lara-Ortiz T, Riveros-Rosas H, Aguirre J. 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 50:1241–1255.
36. Lara-Rojas F, Sanchez O, Kawasaki L, Aguirre J. 2011. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK Saka to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* 80:436–454.
37. Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225:1245–1253.
38. Lee BN, Adams TH. 1996. FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *EMBO J.* 15:299–309.
39. Lee BN, Adams TH. 1994. 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.
40. Lee BN, Adams TH. 1994. 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.
41. Lin Y, et al. 2011. A putative transcription factor MYT1 is required for female fertility in the ascomycete *Gibberella zeae*. *PLoS One* 6:e25586. doi:10.1371/journal.pone.0025586.
42. Malagnac F, Lalucque H, Lepere G, Silar P. 2004. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 41:982–997.
43. Marhoul J. 1996. Isolation and characterization of developmental regulatory genes. Ph.D. thesis. Texas A&M University, College Station, TX.
44. Marquez-Fernandez O, et al. 2007. Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot. Cell* 6:710–720.
45. Meneses E, et al. 2010. The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 455:32–42.
46. Meyer GB. 1999. Characterization of the *flbC* developmental locus and a screen for loss-of-function *flbC* suppressors in *Aspergillus nidulans*. M.S. thesis. Texas A&M University, College Station, TX.
47. Miller KY, Wu J, Miller BL. 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6:1770–1782.
48. Mirabito PM, Adams TH, Timberlake WE. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57:859–868.
49. Myrset AH, et al. 1993. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J.* 12:4625–4633.
50. Nayak T, et al. 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172:1557–1566.
51. Oh IH, Reddy EP. 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18:3017–3033.
52. Pinson B, Brendeford EM, Gabrielsen OS, Daignan-Fornier B. 2001. Highly conserved features of DNA binding between two divergent members of the Myb family of transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29:527–535.
53. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141–238.
54. Prade RA, Timberlake WE. 1993. The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J.* 12:2439–2447.
55. Rodriguez-Sanchez L, et al. 2011. The fission yeast rDNA-binding protein Reb1 regulates G1 phase under nutritional stress. *J. Cell Sci.* 124:25–34.
56. Rodriguez-Urra AB, et al. 2012. Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol.* 7:599–606.
57. Rosen S, Yu JH, Adams TH. 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.
58. Rubio V, et al. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15:2122–2133.
59. Sanchez O, Aguirre J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet. Newsl.* 43:48–51.
60. Sanchez O, Navarro RE, 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.
61. Seo JA, Han KH, Yu JH. 2004. The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 53:1611–1623.
62. Shon KT, Yoon KS. 2002. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 30:117–127.
63. Skromne I, Sanchez O, Aguirre J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21–28.
64. Soid-Raggi G, Sanchez O, 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.
65. Stinnett SM, Espeso EA, Cobeno L, Araujo-Bazan L, Calvo AM. 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63:242–255.
66. Stober-Grasser U, et al. 1992. The Myb DNA-binding domain is highly conserved in *Dictyostelium discoideum*. *Oncogene* 7:589–596.
67. Tamame M, Antequera F, Santos E. 1988. Developmental characterization and chromosomal mapping of the 5-azacytidine-sensitive *fluF* locus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell* 8:3043–3050.
68. Tamame M, Antequera F, Villanueva JR, 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.
69. Tapia R. 1996. Caracterización genética y fisiológica de una mutante afectada en el inicio de la esporulación asexual en *Aspergillus nidulans*. M.S. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
70. Timberlake WE, Clutterbuck AJ. 1994. Genetic regulation of conidiation, p 383–427. In Martinelli SD, Kinghorn JR (ed), *Aspergillus: 50 years on*, vol 29. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
71. Toews MW, 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.
72. Tsiatsigiannis DI, Keller NP. 2007. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* 15:109–118.

73. Vallim MA, Miller KY, Miller BL. 2000. *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn+2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol. Microbiol.* **36**:290–301.
74. Veal E, Day A. 2011. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid. Redox Signal.* **15**:147–151.
75. Vienken K, Fischer R. 2006. The Zn(II)₂Cys₆ putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **61**:544–554.
76. Wieser J, Adams TH. 1995. flbD encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.* **9**:491–502.
77. Wieser J, Lee BN, Fondon J, 3rd, Adams TH. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **27**:62–69.
78. Wu L, Osmani SA, Mirabito PM. 1998. A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **141**:1575–1587.
79. Yang L, 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.
80. Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:1470–1474.
81. Yu JH. 2010. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* **38**:229–237.
82. Yu JH, et al. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **41**:973–981.
83. Yu JH, Wieser J, Adams TH. 1996. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* **15**:5184–5190.

D.R. © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2):98-108, 2013

LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TIPO MYB, UNA FAMILIA DE REGULADORES DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR CONSERVADA EN LOS ORGANISMOS EUCARIONTES

Jenny Arratia* y Jesús Aguirre**

Depto. de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70-242, C.P. 04510, Deleg. Coyoacán, México, D.F. E-mail: *jarratia@email.ifc.unam.mx; **jaguirre@ifc.unam.mx

RESUMEN

La familia de proteínas Myb, ubicada en los eucariontes, se caracteriza por la presencia de un dominio de unión al ADN característico denominado dominio Myb. Éste consiste en una secuencia de aminoácidos conservados (50-53 aminoácidos) que puede estar repetida entre dos (dominio mínimo de unión al ADN) y hasta cuatro veces en la misma proteína. En las plantas, la familia Myb es muy numerosa, mientras que en los animales sólo se encuentran tres miembros, y en otros eucariontes se ha identificado al menos a un miembro de esta familia. Las proteínas Myb participan como activadores o represores transcripcionales en la regulación de procesos celulares fundamentales en el metabolismo o la diferenciación celular. La actividad de las proteínas Myb se regula a través de diversas modificaciones post-traduccionales dentro de las que destacan el estado redox, la fosforilación y la ubiquitinación.

Palabras Clave: Diferenciación celular, *flbD*, hongos, Myb, regulación redox.

ABSTRACT

Myb family proteins are ubiquitous in eukaryotes, and contain a characteristic DNA binding domain called Myb domain. The Myb domain consists in a conserved amino acid sequence (50-53 amino acids) that can be repeated from two (essential domain for DNA binding) to four times in the same protein. In plants, the Myb family is very numerous while in animals there are only three members; at least, one member of this family has been identified in other eukaryotes. Myb proteins participate as transcriptional activators or repressors in the regulation of fundamental cellular processes in metabolism or cell differentiation. Activity from Myb proteins is regulated through several post-translational modifications: redox state, phosphorylation and ubiquitylation stand out among them.

Key Words: Cell differentiation, *flbD*, fungi, Myb, redox regulation.

INTRODUCCIÓN

La regulación de la expresión genética a nivel de la transcripción es un mecanismo de control ubicuo en muchos procesos biológicos, como el crecimiento, la diferenciación celular y el metabolismo. Durante el proceso de la transcripción se requiere de la participación de varios factores, que incluyen los complejos remodeladores de cromatina, los factores del complejo de pre-iniciación y el complejo del ARN polimerasa II. Además, se requiere de

otros factores que regulan la fuerza del promotor, los cuales se denominan factores de transcripción (FT). Los factores de transcripción son proteínas que reconocen y se unen al ADN (ácido desoxirribonucleico), reconociendo una secuencia específica. Una vez unidos a la región promotora, generalmente cerca del inicio de la transcripción de su gen blanco, aunque también pueden unirse a otros factores o incluso al ARN polimerasa directamente, regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Los FT pueden actuar como activadores, represores o ambos (si tienen una estructura modular) de la transcripción de su(s) gen(es) blanco. Con base en la estructura

Nota: Artículo recibido el 04 de marzo de 2013 y aceptado el 07 de junio de 2013.

del dominio de unión al ADN, los factores de transcripción se han podido clasificar en familias, como los factores con: dedos de zinc, hélice-giro-hélice, cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice, entre otros.

Dentro de la familia de FT hélice-giro-hélice se encuentran los factores de transcripción tipo Myb. El primer gen *myb* que se identificó fue el oncogen *v-myb* del virus del mieloblastoma aviar¹. Desde entonces, se han identificado diversas proteínas con dominios Myb en los protozoarios, los hongos, las algas, las plantas y los animales²⁻⁷.

En general, los FT Myb se han implicado en la regulación de procesos fundamentales, como el control de la proliferación y la diferenciación celular, la regulación del metabolismo y la señalización celular en respuesta a estímulos externos.

En este trabajo, discutimos la clasificación de los factores Myb, con base en sus características estructurales, sus funciones y mecanismos de regulación, en diversos organismos eucariontes.

EL DOMINIO MYB

Una característica común de las proteínas Myb es la presencia de un dominio de unión al ADN que se encuentra conservado entre los animales, las plantas, los protozoarios y los hongos, típicamente cerca de la región N-terminal. Un dominio Myb mínimo consiste en dos regiones de cerca de 50 aminoácidos de longitud, que son capaces de formar tres hélices alfa (H1-H3) cada una, y así unirse al ADN⁸. Gran parte de las proteínas Myb presentan tres secuencias repetidas imperfectas (designadas como R1, R2 y R3)⁸ de esta región, aunque también se han identificado proteínas con cuatro o más segmentos repetidos⁹ (Figura 1). Cada una de estas secuencias repetidas imperfectas

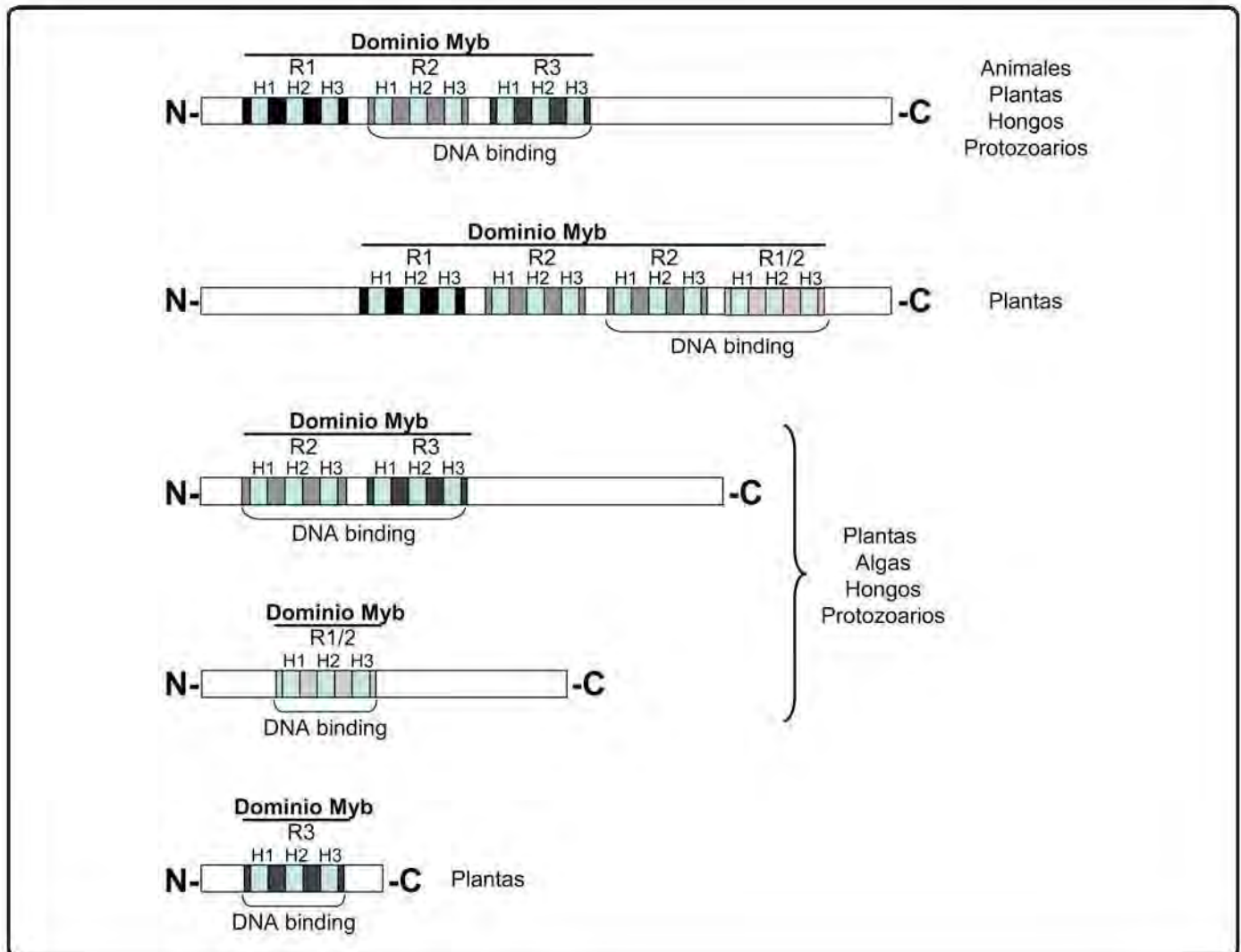


Figura 1. Clases de proteínas Myb. El esquema muestra las diferentes clases de proteínas Myb presentes en los organismos eucariontes dependiendo del número de secuencias repetidas, señaladas por R1, R2, R3. Se indica la estructura secundaria (hélice) mediante las barras H1, H2, H3 y el dominio de unión al ADN por medio de corchetes.

contiene tres residuos de triptófano (o aminoácidos hidrofóbicos) espaciados regularmente¹⁰ (Figura 2), los cuales constituyen un centro hidrofóbico en el plegamiento tridimensional hélice-giro-hélice de cada región repetida¹¹, que le confiere estabilidad a la unión al ADN.

Las secuencias repetidas de la proteína Myb prototipo, la proteína c-Myb, son referidas como R1, R2, y R3. Los segmentos repetidos de otras proteínas Myb se nombran de acuerdo a su similitud con R1, R2 ó R3 de c-Myb. Debido a la poca similitud en la secuencia fuera del dominio Myb, las proteínas Myb se han clasificado de acuerdo al número de secuencias repetidas adyacentes: Myb R1R2R3 (Myb 3R), Myb R2R3, Myb R (o relacionados a Myb) y Myb R1R2R2R1/2 (Myb 4R) (Figuras 1).

Sólo las secuencias R2 y R3 se requieren para la unión al ADN en forma específica (dominio mínimo de unión al ADN)⁸, mientras que R1 se piensa que estabiliza el complejo ADN-proteína a través de interacciones electrostáticas^{12,13}. El elemento de reconocimiento de Myb en el ADN (MRE por sus siglas en inglés)

se definió como la secuencia consenso PyAACG/TG^{14,15}. Esta secuencia se reconoce a través del motivo doble HTH (hélice-giro-hélice), usando la tercer hélice alfa de reconocimiento (más conservada), una de R2 y una de R3, que unidas al ADN están empacadas en el surco mayor¹⁶. Los residuos clave que hacen contacto directo con las bases del ADN incluyen K128 (R2), N183 (R3) y K182 (R3)¹⁷. De este modo, la primera mitad del sitio, YAAC, es reconocido principalmente por R3 y la segunda mitad del sitio, NGH, por R2¹⁶, lo que da la apariencia de dímeros ligados covalentemente¹³. Las proteínas Myb R2R3 se cree que se unen al ADN en un modo similar.

Las proteínas Myb con sólo una secuencia repetida no se pueden unir al ADN como tal, sino que deben formar heterodímeros u homodímeros, lo que permite a estas proteínas reconocer al ADN con alta afinidad y especificidad⁹.

La estructura que muestran los segmentos repetidos de las proteínas Myb es parecida a la de los dominios SANT, éstos se han identificado previamente en proteínas reguladoras de la

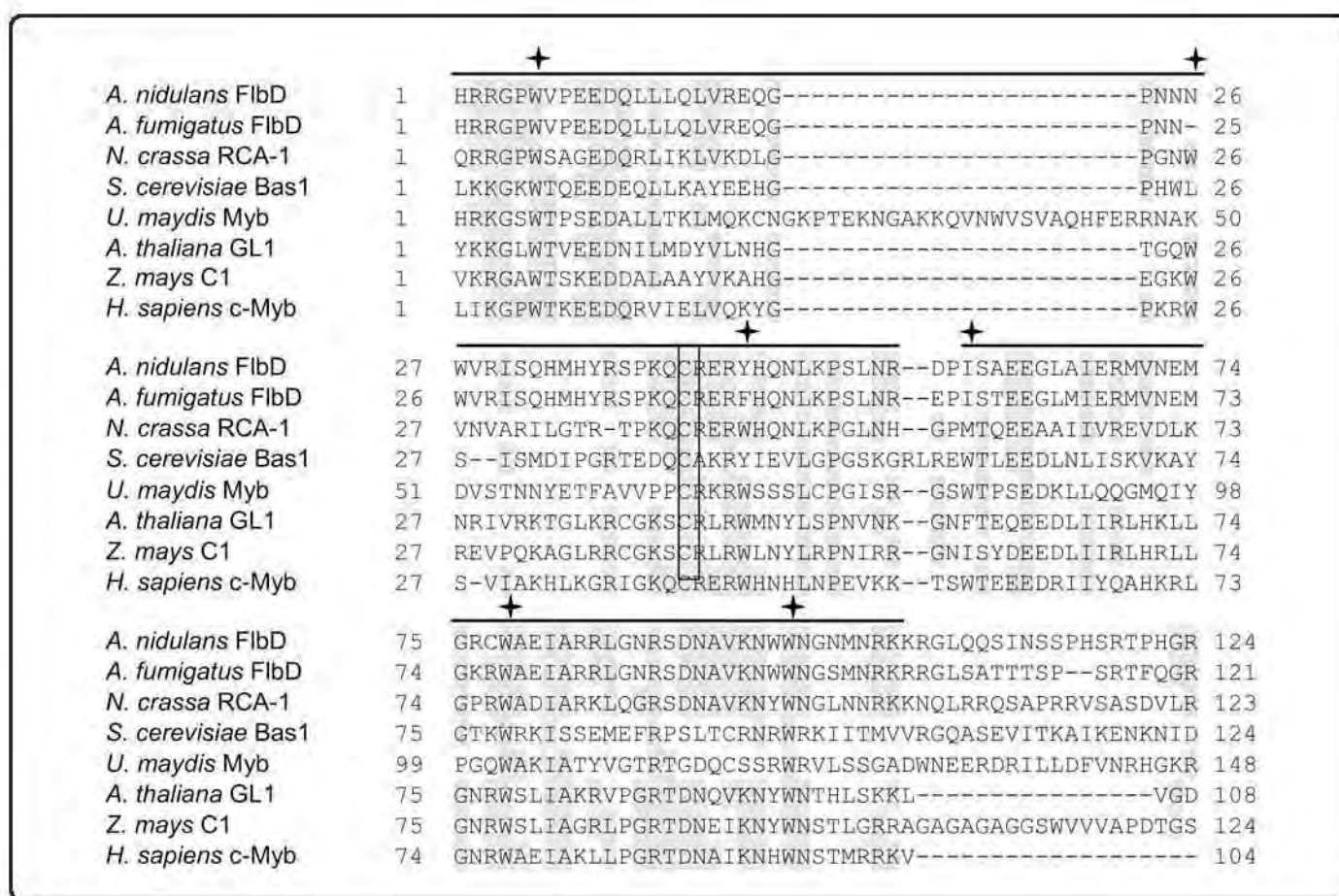


Figura 2. Aminoácidos conservados en dominios Myb R2R3 de distintos grupos filogenéticos. Se indica la longitud de la secuencia repetida R2 y R3 en color negro. Los asteriscos representan los residuos de triptófano o residuos aromáticos espaciados característicos de los dominios Myb. El residuo de cisteína conservado dentro del dominio Myb, el cual está involucrado en la regulación redox de algunas proteínas Myb in vitro se indica en un rectángulo.

cromatina, como *Swi3* de levadura, *Ada2* de levadura, *NcoR* de humano, *TFIIIB* de levadura e *ISWI*¹⁸. Los dominios SANT son incapaces de unirse al ADN pero reconocen las colas de las histonas e interaccionan con enzimas modificadoras de histonas, como las acetilasas y desacetilasas, y complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP¹⁹, de este modo facilitan el reconocimiento del sustrato y aumentan la actividad de las enzimas modificadoras de histonas²⁰.

LAS PROTEÍNAS MYB EN LOS ANIMALES

Dentro del genoma de los vertebrados se reportan pocos genes *myb*, sus productos se clasifican en tres formas generales, A-Myb, B-Myb y c-Myb, que comparten los dominios de unión al ADN con secuencias de aminoácidos similares y que se unen a la misma secuencia de reconocimiento^{3,21,22}. Como se ha indicado, estas proteínas contienen en la parte amino terminal las tres secuencias repetidas características (R1, R2 y R3) (Figura 1). Además, se ha identificado un dominio de activación transcripcional como una región hidrofílica en la parte central de la proteína, mientras que la parte carboxilo terminal podría representar un dominio regulador negativo³.

c-myb se expresa en un número limitado de tipos celulares diferenciados y también tiene un papel crítico en las etapas tempranas de la hematopoyesis. En las células hematopoyéticas juega un papel en regular el balance entre la proliferación y la diferenciación. En efecto, la sobre-expresión de *c-myb* inhibe la diferenciación del precursor de células hematopoyéticas, mientras que la pérdida de expresión inhibe la proliferación y causa falla de la hematopoyesis intrafetal lo que lleva a la muerte³. *A-myb* se expresa en el sistema nervioso central durante el desarrollo, en la línea germinal de los linfocitos B, en el epitelio de los conductos de la glándula mamaria y en los testículos. A-Myb regula de manera positiva la proliferación celular, la inactivación de *A-myb* en ratón causa un bloqueo en el desarrollo de la glándula mamaria y una espermatogénesis restringida. *B-myb* es un gen que se expresa de forma ubicua y regula en forma positiva el crecimiento y la diferenciación celular; la inactivación de *B-myb* en ratones produce la muerte del feto en etapas tempranas del desarrollo²³.

Se ha reportado que el dominio de unión al ADN de c-Myb interacciona con la cola N-terminal de las histonas H3 y H3.3, lo que las hace accesibles para ser acetiladas en K18 y K23. La unión a la cola de la histona y la acetilación junto con las proteínas de unión al *enhancer* CCAAT (C/EBP, bZIP), son necesarias para la activación de los genes de diferenciación *mim-1* y lisozima en células hematopoyéticas. La sustitución de los tres aminoácidos (I91N, L106H, y V117D) en R2 determina la carcinogenicidad de la oncoproteína retroviral v-Myb, ya que en estos casos se produce una interacción defectuosa con C/EBP y se elimina la interacción con la histona H3 y su acetilación, con lo que se inhibe la activación de los genes de diferenciación celular. Esto demuestra que Myb tiene una función directa en la organización

de la cromatina y la modificación de las histonas a través de su dominio de unión al ADN y que estas funciones están ausentes en la variante leucemogénica²⁰. Estos datos indican que las proteínas Myb regulan la expresión genética, probablemente a través de la modificación del estado de la cromatina (acetilación).

LAS PROTEÍNAS MYB EN LAS PLANTAS

A diferencia de lo que ocurre en los animales, la familia de proteínas Myb es una de las clases de factores de transcripción más numerosa en las plantas^{9,24}. Se han identificado aproximadamente 200 genes *myb* en la planta de algodón²⁵, más de 125 genes que codifican para proteínas Myb en el genoma de *Arabidopsis*, más de 80 genes en maíz y aproximadamente 30 genes *myb* en *Petunia hybrida*, los cuales exhiben entre el 40% y el 60% de identidad con el dominio Myb de la proto-oncoproteína c-Myb de los vertebrados²⁶⁻²⁸.

En las plantas se encuentran las cuatro clases o subfamilias de proteínas Myb descritas: Myb4R, que contiene cuatro segmentos repetidos parecidos a R1/R2; Myb R, proteínas con un solo segmento repetido Myb o una secuencia repetida parcial; Myb 3R, que contiene tres segmentos repetidos y Myb R2R3, con dos segmentos repetidos (Figura 1), y que es la subfamilia más abundante. Se han identificado varias funciones bien definidas para los factores de transcripción Myb en las plantas: controlan el metabolismo primario y secundario (biosíntesis de flavonoides y antocianinas), el ciclo celular (regulación de la expresión de la ciclina B y otros genes en la transición de la fase G2/M²⁹) y la morfogénesis celular (regulan la formación de los tricomas y los pelos de la raíz), tienen papeles en la embriogénesis³⁰, controlan la diferenciación de la cubierta externa de la semilla, la forma de las células epidérmicas de los pétalos, el desarrollo de la inflorescencia temprana y la germinación de las semillas, regulan el crecimiento celular, la fotosíntesis, la floración y el movimiento de las hojas en relación al fotoperíodo^{29,31} al activar la expresión de genes diurnos mientras bloquean la expresión de genes nocturnos³². Además participan en el desarrollo y en la regulación de genes de respuesta al estrés biótico y abiótico, como el estrés osmótico y el salino, la desecación, la congelación, la limitación de fósforo, la presencia de hormonas y el ataque de patógenos^{2,5,9,29,33}. Se ha visto que varias proteínas Myb R2R3 son necesarias para la formación de la raíz y el control de la biosíntesis de la pared celular: activan la síntesis de lignina en fibras y/o vasos; regulan la deposición de lignina en las raíces, la deposición de celulosa y xilano, el desarrollo y/o funcionalidad de las anteras, el grosor de la pared celular en fibras celulares, la producción de mucílago, el control de la apertura de los estomas, la biosíntesis de glucosinolato y glucosinolatos alifáticos en segmentos aéreos, la producción de glucosinolatos indólicos en raíces y en las hojas de roseta en estado tardío⁹.

Algunas de las funciones de diversos miembros de la familia Myb de plantas y otros organismos eucariontes como las algas y los protozoarios se resumen en la Tabla I. El estudio de diversas

funciones biológicas en organismos unicelulares como las algas, resulta importante para entender el origen y evolución de los organismos eucariontes fotosintéticos. Asimismo la identificación y estudio de los homólogos del proto-oncogen *myb* en protistas ciliados apoya el origen en eucariontes unicelulares³⁴.

LAS PROTEÍNAS MYB EN LOS HONGOS

En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* se identificó el gen *flbD* como miembro de la familia *myb* que incluye al proto-oncogen *c-myb*. El dominio de unión al ADN de FlbD contiene dos secuencias repetidas con un arreglo estructural clásico de la proteína c-Myb (Figura 3), pero a diferencia de

Organismo	Proteína y/o Familia	Función	Ref.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	pc-Myb, MybR1R2R3	Control del ciclo celular: regula la expresión de la ciclina B y otros genes en la transición de la fase G2/M	9, 29, 31, 35, 36
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYB12, PAP1, PAP2	Síntesis de flavonoides y antocianinas	37
<i>Oryza sativa</i>	OsMYB3R-2	Regulación de la vía DREB/CBF de respuesta al estrés	29
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CCA1, LHY, Myb SHAQK(F/Y)	Componentes del oscilador central circadiano: regulan el crecimiento celular, la fotosíntesis, la floración y el movimiento de las hojas	9, 29, 31, 32
<i>Arabidopsis thaliana</i> y otras plantas	Myb R2R3	Regulación de la biosíntesis de flavonoides y antocianinas, biosíntesis de la pared celular, embriogénesis	9, 29, 30
Plantas diversas	MybR1	Control de la morfogénesis celular y el metabolismo secundario, respuesta a la limitación de fosfato	5, 9, 29, 33, 37
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Psr1, MybR1	Respuesta a la limitación de fostafo	33
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	CmMYB1, MybR2R3	Asimilación de nitrógeno	38
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhMyb10, MybR2R3 Otros MybR2R3 EhMyb-dr, MybSHAQKY	Transducción de señales, transporte vesicular, respuesta a choque térmico y virulencia Regula genes de enquistamiento	6 39
<i>Giardia lamblia</i>	gMyb2, MybR1R1	Síntesis de proteínas de la pared del quiste	40
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdMyb1, MybR1R2R3 DdMYB2, MybR1R2R3 DdMyb3, MybR1R2R3	Desconocida Expresión del gen <i>ACA</i> y producción de cAMP extracelular (quimiotaxis, agregación y diferenciación) Formación del tallo del cuerpo fructífero, síntesis de los factores peptídicos SDF-1 y SDF-2, maduración de esporas	4 41 42
	MybE, MybSHAQKY	Regula genes inducibles DIF en células para formar el tallo y genes del cuerpo fructífero	43
<i>Phytophthora infestans</i>	MybR2R3 MybR1R2R3	Esporulación y liberación de zoosporas	44
<i>Sterkiella histriomuscorum</i>	MybR1R2R3	Crecimiento vegetativo	34
<i>Euplotes aediculatus</i>	MybR2R3	Crecimiento vegetativo	34

Tabla I. Función de las proteínas Myb en diversos organismos.

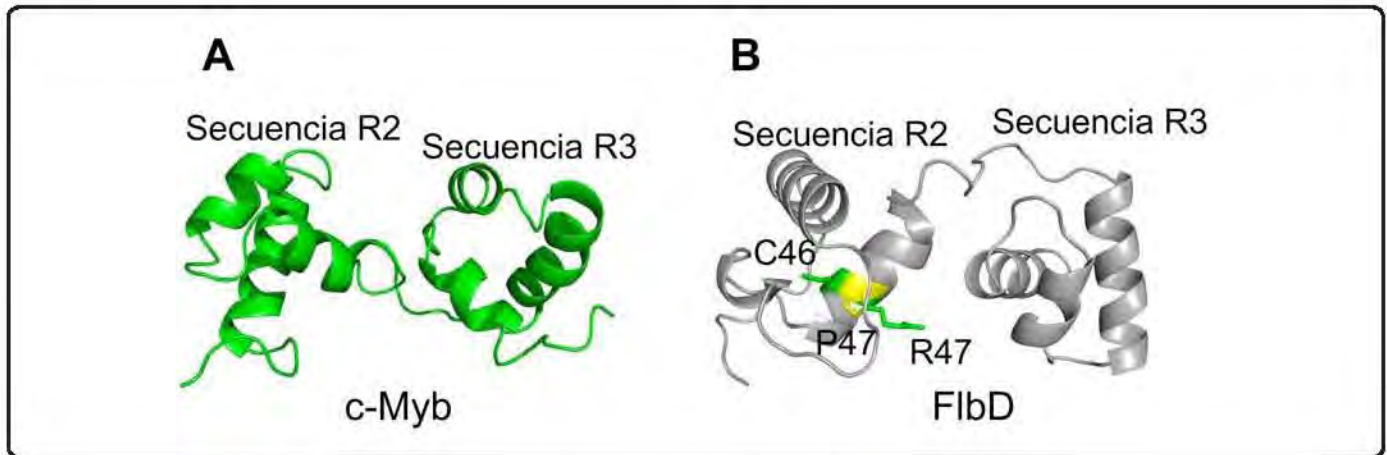


Figura 3. Dominio Myb de la proteína c-Myb y un modelo de la región correspondiente de F1bD. Representación de Ribbon del dominio de unión al ADN R2R3 de la proteína Myb F1bD de *A. nidulans* (color gris) (B) basado en el modelo de la proteína c-Myb (color verde) (código PDB 1MSF P06876) (A). Los residuos C46 y R47 corresponden a los aminoácidos conservados en diversos miembros de la familia Myb. Se ha reportado que C46 juega un papel en la regulación redox *in vitro*. El cambio R47P en F1bD resulta en una proteína inactiva⁴⁵, lo cual podría deberse a la consecuente disminución del pKa de la C46 y la disminución de su reactividad. Las proteínas fueron modeladas con el programa PyMOL.

los dominios clásicos que contienen tres residuos de triptófano críticos espaciados cada 18 ó 19 aminoácidos, cada uno presenta sólo dos triptófanos con una tirosina en la posición esperada para el tercer triptófano en la primera secuencia repetida, y una isoleucina en la posición del primer triptófano de la segunda secuencia repetida⁷ (Figura 2). Estas sustituciones han sido observadas en otras proteínas Myb de plantas que mantienen su función como activadores transcripcionales (Figura 2). Además contiene el residuo de cisteína altamente conservado entre los miembros de la familia Myb en la secuencia repetida R2 (Figura 2), el cual se ha propuesto que tiene un papel en la regulación redox de la unión de Myb al ADN^{46,47}.

flbD se expresa de manera constitutiva en hifas vegetativas y en etapas tempranas del desarrollo asexual^{7,48}. Recientemente, se ha encontrado que F1bB, un factor de transcripción bZIP, activa la expresión de *flbD* y que ambos factores en conjunto activan la expresión del gen *brlA* (codifica para un factor de transcripción con dos dominios de dedos de zinc), el regulador primario de la conidiación en *A. nidulans*⁴⁸. Adicionalmente, se ha identificado una nueva función para F1bD en el desarrollo sexual, las mutantes en *flbD* son incapaces de desarrollar el peridio, un tejido externo especializado que se diferencia durante la formación de los cuerpos fructíferos y termina rodeando las ascas y las esporas sexuales. Las esporas desnudas producidas por una mutante en *flbD* son viables y su desarrollo depende de la NADPH oxidasa NoxA aun en un fondo *flbD* nulo⁴⁵.

En el hongo *Neurospora crassa* se ha identificado el homólogo funcional del gen *flbD* de *A. nidulans*. Ese gen se denominó

rca-1 (regulador de la conidiación en *Aspergillus*) y codifica para una proteína de 229 aminoácidos que muestra el 57% de identidad con F1bD en la región del dominio de unión al ADN. *rca-1* puede complementar el defecto de conidiación de la mutante en *flbD*; además la expresión forzada de *rca-1* induce la conidiación de *A. nidulans* en cultivos sumergidos como ocurre con la sobreexpresión de *flbD*. Sin embargo, no se ha demostrado si *rca-1* también complementa los defectos de la mutante en *flbD* durante el desarrollo sexual. Por otro lado, la cancelación de *rca-1* en *N. crassa* no tuvo efecto sobre el crecimiento, la macroconidiación, la microconidiación o la formación de ascosporas (la mutante nula se comporta igual a la cepa silvestre como cepa femenina o masculina en cruces meióticas). El único fenotipo que presentó la mutante *rca-1* fue un crecimiento hifal recto o en contra de las manecillas del reloj, en comparación con la cepa silvestre donde se observa crecimiento espiral en el sentido de las manecillas del reloj⁴⁹.

En el ascomiceto patógeno de plantas *Gibberella zeae* se encontraron dos genes que codifican para un posible factor de transcripción tipo Myb (*MYT1* y *MYT2*, respectivamente). *MYT1* se expresa de manera constitutiva durante el estado vegetativo y el desarrollo sexual. La cancelación de *MYT1* da por resultado la producción de peritecios con ascosporas inmaduras cuando se realizan cruces homotálicas o en cruces como cepa femenina. Una mutante nula no muestra un fenotipo en el crecimiento vegetativo, la producción de conidias, la germinación, la virulencia y la producción de micotoxinas. Sin embargo, la sobreexpresión de *MYT1* acelera la germinación y el crecimiento, y reduce la producción de micotoxinas en comparación a la cepa silvestre, indicando que *MYT1* afecta la

expresión de los genes involucrados en el crecimiento vegetativo y el metabolismo secundario⁵⁰. Por su parte, *MYT2* regula el tamaño de los peritecios. La sobreexpresión de *MYT2* muestra fenotipos pleiotrópicos que afectan el crecimiento vegetativo, la producción de conidias, la virulencia y la producción de micotoxinas⁵¹.

En *Saccharomyces cerevisiae*, Bas1p contiene el dominio de unión al ADN localizado en la parte N-terminal de la proteína. Este dominio está compuesto de tres secuencias repetidas en tandem conteniendo residuos de triptófano altamente conservados (Figura 2), que son esenciales para la unión al ADN y para su función *in vivo*⁵². Bas1p en conjunto con Bas2p, una proteína homeodominio, se requieren para activar la expresión de los genes de biosíntesis de AMP en levadura a partir de 5' fosforibosil-1-pirofosfato (genes *ADE*). La expresión de esos genes disminuye a nivel transcripcional en presencia de adenina exógena en el medio. De este modo, estos genes también se requieren para la regulación por adenina y además activan la expresión de tres genes en la vía de biosíntesis de la histidina⁵³.

Además de los residuos de triptófano conservados, Bas1p contiene en la segunda secuencia repetida un residuo de cisteína, C153, que como se ha mencionado, está conservado en muchos de los miembros de la familia Myb (Figura 2). Este residuo ha sido mostrado como crítico para la regulación redox de la unión al ADN de c-Myb *in vitro*^{46,47}. Sustituciones del residuo de cisteína C153 en Bas1p indican que no obstante su muy alta conservación, éste no es estrictamente requerido para llevar a cabo la función de Bas1p. Al sustituirlo por aminoácidos cargados (C153R, C153K y C153D) se obtuvo una proteína carente de función *in vitro* e *in vivo*. En cambio al reemplazarla con un residuo pequeño hidrofóbico (C153A, C153S y C153V) la proteína fue completamente funcional *in vitro* e *in vivo*. La C153 es accesible a un agente alquilante en la proteína libre y es protegida al ponerse en contacto con el ADN previamente, ya que al unirse con el ADN se genera un cambio conformacional en donde la cisteína queda empacada en el núcleo hidrofóbico de la secuencia repetida R2⁵⁴, como ocurre en el caso de c-Myb. Adicionalmente, dentro del dominio de unión al ADN, Bas1p contiene otros dos residuos de cisteína, uno en cada secuencia repetida. La mutación de los residuos C82A y C206V en el primer y tercer segmento repetido respectivamente, mostró que estos residuos tampoco son esenciales para la función de Bas1p. No obstante, se ha visto que la unión de Bas1p al ADN *in vitro* se inhibe completamente en presencia de diamida o selenito de sodio⁵¹, lo que indica que Bas1p es susceptible a la oxidación, dependiendo principalmente del residuo de cisteína C153 localizado en el segundo segmento repetido del dominio de unión al ADN, ya que la mutación de los residuos C82A y/o C206V, sólo en combinación con la mutación en la C153V, muestran resistencia a la oxidación por diamida y son capaces de unirse al ADN *in vitro*⁵⁴.

Para demostrar la función de Bas1p *in vivo*, se reemplazaron los tres residuos de cisteína por residuos hidrofóbicos (C82A, C153V, C206V), produciendo una proteína cuya capacidad de unión al ADN *in vitro* en condiciones de concentración elevada de diamida no se vio afectada. Sin embargo, en una mutante BAS1 carente de las tres cisteínas, la expresión de los genes *ADE* está reprimida después del tratamiento con diamida. Esto indica que la sensibilidad redox de la unión al ADN de Bas1p a través de los residuos de cisteína observada *in vitro* no es responsable de la regulación redox de los genes *ADE in vivo*. Asimismo, la regulación redox de los genes *ADE* requiere la interacción de las proteínas Bas1p y Bas2p para restaurar la expresión de los genes *ADE* aún en condiciones de estrés oxidante. Por otro lado, al estudiar la interacción de Bas1p y Bas2p se encontró que ésta es bloqueada por estrés oxidante como sugiere una fusión experimental Bas1p-Bas2p⁵⁵, aunque no se ha demostrado el mecanismo por el cual la interacción Bas1p/Bas2p se daña en condiciones de estrés oxidante.

REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MYB

Los dominios de unión al ADN en un factor de transcripción tienen su principal función en reconocer una secuencia específica del ADN, pero además pueden llevar a cabo interacciones proteína-proteína. El dominio Myb puede ser modificado a nivel post-traducciona por fosforilación, ubiquitinación, acetilación, sumoilación y por el estado redox. Estas modificaciones pueden afectar la actividad de Myb al alterar el nivel de proteína, la unión al ADN o la capacidad de transactivación^{23,56,57}. En las plantas se ha visto que los genes *myb* también pueden ser blanco de microRNAs (miRNAs) y de silenciamiento de RNAs (ta-siRNAs)⁹.

En estudios comparativos entre los tres DBD (DNA binding domain, por sus siglas en inglés) de A-Myb, B-Myb y c-Myb de vertebrados, se observó que éstos se comportan diferente como sustratos para diferentes cinasas: la proteína caseína cinasa II (CK2) y la cinasa dependiente de cAMP (PKA) fosforilan el DBD de c-Myb. Los tres DBD son fosforilados por CK2 en la región N-terminal, aunque en distintos sitios, probablemente en R1, mientras que sólo c-Myb es fosforilado por PKA. En cambio B-Myb no tiene conservado el sitio de fosforilación para PKA²³.

Por otra parte, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), p42^{mapk}, fosforila a c-Myb murino en S528, localizada cerca al dominio de regulación negativa hacia la parte carboxilo terminal de la proteína. El reemplazo de esta serina con alanina (S528A) mejora la habilidad de c-Myb para activar la expresión de un promotor sintético *in vivo* e incrementa la transcripción de algunos genes blanco⁵⁸. Asimismo, durante el desarrollo temprano del xilema, la MAPK p42^{mapk} (PtMAPK6) puede fosforilar la proteína Myb R2R3 PtMYB4 de la planta *Pinus taeda* en el residuo S236, localizado en el dominio de activación carboxilo terminal en un contexto que se comparte con otras

proteínas Myb de plantas. La fosforilación de ese residuo no afecta la unión al ADN *in vitro* pero sí altera la habilidad de PtMYB4 para promover la activación transcripcional en la levadura⁵⁹. Algunas proteínas Myb R1R2R3, Myb R1, Myb R4 o parecidas a Myb, son reguladas positivamente por fosforilación vía un complejo de cinasas dependiente de ciclinas en la etapa G2/M del ciclo celular, lo cual elimina la actividad reguladora negativa de la región C-terminal de Myb^{9,59}.

La cisteína es uno de los residuos de aminoácido más conservados durante la evolución de las proteínas y ha sido implicado en unión al ADN, interacciones proteína-proteína y la regulación redox de varias proteínas⁶⁰. Las proteínas Myb parecen regularse por redox. En la secuencia repetida R2 contienen un residuo de cisteína invariante (Figura 2), C130 (en c-Myb de humano), cuya reducción es esencial para la unión de c-Myb al ADN *in vitro*. Este residuo es sensible a condiciones oxidantes, impidiendo la unión específica al ADN, ya que controla el cambio conformacional en R2 inducido por la unión al ADN⁴⁷. No obstante, en la proteína v-Myb la sustitución C65S (equivalente a la C130 de c-Myb) no activa la transcripción *in vivo* ni transforma células mieloides, aunque sí es transportada al núcleo⁶⁰.

Las proteínas A-, B- y c-Myb de vertebrados tienen una cisteína adicional en R1, localizada en una posición que corresponde a C130 en R2. A-Myb contiene sólo esas dos cisteínas, pero c-Myb contiene una tercer cisteína en la región N-terminal, mientras que B-Myb contiene cuatro cisteínas distribuidas a través del DBD. La sensibilidad redox de A-Myb es comparable a c-Myb, mientras que B-Myb es mucho más sensible a condiciones oxidantes comparado con las otras dos proteínas²³, lo cual podría explicarse por la presencia de los cuatro residuos de cisteína en el dominio de unión al ADN. Estos estudios acerca de la sensibilidad redox se realizaron incluyendo la región amino terminal y el dominio Myb R1R2R3 y no se observaron los mismos efectos con las secuencias repetidas R2R3 de c-Myb⁶¹. Esto sugiere que la cisteína de la segunda secuencia repetida en A- y c-Myb tienen un papel mayor en la modificación redox de unión al ADN. La hipótesis coincide con el análisis minucioso de la modificación de la cisteína C153 en Bas1p de *S. cerevisiae*, indicando que la sensibilidad redox de la cisteína de la segunda secuencia repetida es una característica altamente conservada de la familia Myb⁵⁴. Dado que ni la región amino terminal ni la secuencia repetida R1 participan directamente en el reconocimiento del ADN, la oxidación de las cisteínas en esas regiones no parece tener efecto alguno sobre la interacción con el ADN.

En *A. nidulans* se evaluaron los efectos de alelos mutantes que afectan la actividad de unión de FlbD al ADN (R47P, R47K, C46D, C46S y C46A) en el desarrollo asexual y sexual. La modificación de R47P se presume que disminuye la reactividad de la cisteína C46 al modificar su pKa (Figura 3), mientras que R47K resulta equivalente en la carga aunque no en tamaño. Los

diversos alelos mutantes en la C46 y R47 mostraron defectos en la conidiación, excepto la mutante *flbD*^{C46A} que sólo mostró el defecto en cultivos líquidos en condiciones de limitación de nitrógeno. Este último dato sugiere que FlbD también participa en la respuesta a la limitación de nitrógeno⁴⁵, como CmMYB1 en el alga *Cyanidioschyzon merolae*, e induce la expresión de genes necesarios para la asimilación de nitrógeno, *CmNRT* (codifica para un transportador de nitrato/nitrito), *CmNAR* (codifica una nitrato reductasa), *CmNIR* (codifica para una nitrito reductasa), *CmAMT* (codifica para un transportador de amonio de alta afinidad), y *CmGS* (codifica para una glutamino sintetasa)³⁸. Durante el proceso de diferenciación sexual en *A. nidulans* y otros hongos se ha identificado la producción de especies reactivas del oxígeno^{62,63} lo que hace factible la regulación redox de FlbD durante esta etapa. Con respecto a esto, se observó que las mutantes R47K, R47P, C46D y C46S presentan defectos en el desarrollo del tejido peridial (tejido externo que rodea las ascas y las esporas sexuales), mientras que la mutante *flbD*^{C46A} mostró desarrollo normal del peridio y un incremento en la producción de cuerpos fructíferos. Estos datos sugieren que los cambios en la cisteína conservada o en el residuo de arginina contiguo, que también está conservado en otras proteínas Myb, modifican la actividad de unión de FlbD al ADN, que es la responsable de regular la diferenciación asexual y sexual⁴⁵.

Por otro lado, se ha visto que agentes que generan NO (óxido nítrico) inhiben la actividad de unión al ADN de c-Myb y esta sensibilidad depende de la C130 conservada en R2⁶⁴. En plantas también se ha reportado la regulación *in vitro* de la proteína Myb AtMyb2 (proteína Myb R2R3 típica de *Arabidopsis thaliana*) por S-nitrosilación involucrando al residuo de cisteína C53 (equivalente a C130)⁶⁵.

A diferencia de las proteínas Myb R1R2R3 de animales que sólo tienen una cisteína a través de la cual parecen regularse por redox, muchas proteínas Myb R2R3 de plantas contienen dos cisteínas, C49 y C53, siendo la C53 la equivalente a la C130 en las proteínas Myb R1R2R3. La C49 se encuentra conservada en dominios Myb R2R3 típicos, pero no está presente en los dominios Myb atípicos o en los dominios Myb de proteínas PC-Myb (Myb R1R2R3)⁶⁶.

Un ejemplo de proteínas Myb con dos cisteínas es P1, el regulador de la biosíntesis de los flavonoides en maíz, una proteína típica Myb R2R3. Un análisis *in vitro* indicó que la mutante en la C53S se une al ADN en condiciones reducidas, mientras que la C53A se une al ADN tanto en condiciones oxidantes como reductoras. Estos datos indican que la C53 no es esencial para la unión al ADN y en efecto, ninguno de los cambios realizados en C53 afectó la actividad reguladora de P1 *in vivo*. Por su parte, las mutantes C49S y C49A se unen al ADN independientemente de las condiciones redox. En condiciones oxidantes, la C49 y la C53 forman un puente disulfuro que impide la unión del dominio

Myb R2R3 al ADN⁶⁶. La formación de este puente disulfuro podría ser un punto de regulación de la actividad de unión al ADN de las proteínas Myb de plantas, que no se comparte con los dominios Myb de animales.

Adicionalmente, el hecho de que todos los genes regulados por proteínas Myb se expresan en tejidos específicos y sólo en algunas células es considerado como parte del mecanismo de regulación. La especificidad de las proteínas Myb y los genes que son regulados en cada tipo celular en muchas ocasiones requiere la participación de otros factores de transcripción, cofactores o proteínas accesorias cuyo sitio de unión se localiza adyacente a los sitios de unión Myb sobre los promotores. Es con dichas proteínas que los factores Myb cooperan para activar el promotor blanco⁵⁷.

Mediante experimentos de activación transcripcional *in vivo* se ha indicado que para la actividad completa de v-Myb y c-Myb se requiere del MRE (elemento de reconocimiento de Myb) y una extensión adicional río abajo rica en timina, en una cadena específica. La secuencia repetida R1 de c-Myb parece funcionar como una cuña en la formación del complejo Myb-ADN, permitiendo que se abran las secuencias vecinas río abajo en presencia y ausencia de secuencias ricas en AT (adenina-timina), formando así un complejo estable⁶⁷. Este complejo también puede obtenerse a través de otro factor regulador que se une a elementos adyacentes en una región específica del ADN y funciona como un co-activador, que induce de modo similar un asa en la estructura terciaria del promotor para así regular la expresión de genes blanco en conjunto con el factor de transcripción Myb. Algunos ejemplos de este tipo de co-regulación incluyen, c-Myb y AML1 (Runt) que regulan la expresión del receptor de células T murino; C1 (Myb) y R (hélice-giro-hélice) que regulan la expresión del gen *Bronze1* de maíz; Bas1 (Myb) y Bas2/Pho2 (homeodominio) que regulan la expresión del gen *HIS4* de levadura⁶⁷. La interacción proteína-proteína mejor descrita es la cooperación entre factores Myb R2R3 y proteínas del grupo hélice-bucle-hélice básico (bHLH). La especificidad de la interacción entre Myb y la región N-terminal de las proteínas bHLH se ha mapeado con la firma ((D/E)LX₂(R/K)x₃Lx₆Lx₃R) en la secuencia repetida R3. La habilidad de las proteínas R3 para interactuar con proteínas bHLH es crucial para sus funciones reguladoras negativas porque éstas compiten por la unión con sus parejas Myb R2R3, sin embargo, las proteínas R3 no se unen solas al ADN⁹.

La actividad de los factores de transcripción Myb modulada por ubiquitinación ocurre en los residuos de lisina cercanos al dominio de activación de la transcripción, aumentando la actividad transcripcional y/o la degradación. En *Arabidopsis*, AtMYB18, se ubiquitina por COPI1, pero la estabilidad de AtMYB18 puede ser incrementada por interacción con el factor bHLH, HFR1. Por su parte, la modulación de la actividad del factor de transcripción por sumoilación puede ocurrir por

múltiples mecanismos incluyendo cambios en la localización celular, la actividad de unión al ADN o la disminución en la actividad del dominio de activación, como se describió para c-Myb en animales⁹.

CONCLUSIONES

La familia de proteínas Myb se encuentra distribuida en todos los organismos eucariontes desempeñando funciones a nivel celular o bien tejido específicas que incluyen diversos procesos de diferenciación, desarrollo y regulación del metabolismo primario y secundario. Para llevar a cabo las diferentes funciones puede o no requerirse de la participación conjunta de otro tipo de factores de transcripción lo que favorece que la función sea aún más específica. Además las proteínas Myb son sujetos de modificaciones post-traduccionales que regulan la cantidad de proteína y la afinidad de unión al ADN. Dentro de los mecanismos de regulación el estado redox es primordial al determinar la unión al ADN, aunque no se ha demostrado que todas las proteínas Myb sean reguladas de esta forma, la cisteína involucrada se ha mantenido conservada a través de la evolución de la familia Myb.

AGRADECIMIENTOS

Durante los estudios de doctorado Jenny Arratia Quijada contó con el apoyo económico de la DGEP-UNAM y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Número de becario 166609) para la elaboración del presente trabajo. Además, realizó una estancia de investigación en la Facultad de Ciencias de Orsay en París, Francia, la cual estuvo financiada por un donativo del Dr. Claudio Schazzocchio.

Este trabajo fue financiado por los donativos CB-2005-01-49667 y 153256 del CONACYT y IN209211-2 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-UNAM), así como por el donativo en colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 75306.

Se agradece la ayuda del M. en C. César Ismael Ortiz García para modelar la proteína F1bD.

REFERENCIAS

1. Klemptner, K.H., Gonda, T.J. & Bishop, J.M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**, 453-463, doi:0092-8674(82)90138-6 [pii] (1982).
2. Du, H. *et al.* Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Mosc)* **74**, 1-11, doi:BCM74010005 [pii] (2009).
3. Oh, I.H. & Reddy, E.P. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* **18**, 3017-3033, doi:10.1038/sj.onc.1202839 (1999).
4. Stober-Grasser, U. *et al.* The Myb DNA-binding domain is highly conserved in *Dictyostelium discoideum*. *Oncogene* **7**, 589-596 (1992).
5. Rubio, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved

- in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122-2133, doi:10.1101/gad.204401 (2001).
6. Meneses, E. *et al.* The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* **455**, 32-42, doi:S0378-1119(10)00062-4 [pii] 10.1016/j.gene.2010.02.004 (2010).
 7. Wieser, J. & Adams, T.H. flbD encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.* **9**, 491-502 (1995).
 8. Sakura, H. *et al.* Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5758-5762 (1989).
 9. Dubos, C. *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **15**, 573-581, doi:S1360-1385(10)00153-6 [pii] 10.1016/j.tplants.2010.06.005 (2010).
 10. Saikumar, P., Murali, R. & Reddy, E.P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8452-8456 (1990).
 11. Ogata, K. *et al.* The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and transactivation. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 178-187 (1996).
 12. Ording, E., Kvavik, W., Bostad, A. & Gabrielsen, O.S. Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. *Eur. J. Biochem.* **222**, 113-120 (1994).
 13. Ogata, K. *et al.* Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 309-320 (1995).
 14. Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A.E. & Klempner, K.H. Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature* **335**, 835-837, doi:10.1038/335835a0 (1988).
 15. Weston, K. Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3043-3049 (1992).
 16. Ogata, K. *et al.* Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**, 639-648, doi:0092-8674(94)90549-5 [pii] (1994).
 17. Tahirov, T.H. *et al.* Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* **108**, 57-70, doi:S0092867401006365 [pii] (2002).
 18. Aasland, R., Stewart, A.F. & Gibson, T. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 87-88, doi:0968-0004(96)30009-1 [pii] (1996).
 19. Boyer, L.A. *et al.* Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell* **10**, 935-942, doi:S1097276502006342 [pii] (2002).
 20. Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonier, Y., Xu, H. & Leutz, A. Histone H3 tail positioning and acetylation by the c-Myb but not the v-Myb DNA-binding SANT domain. *Genes Dev.* **19**, 2447-2457, doi:gad.355405 [pii] 10.1101/gad.355405 (2005).
 21. Lipsick, J.S. One billion years of Myb. *Oncogene* **13**, 223-235 (1996).
 22. Rosinski, J.A. & Atchley, W.R. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.* **46**, 74-83 (1998).
 23. Bergholtz, S. *et al.* The highly conserved DNA-binding domains of A-, B- and c-Myb differ with respect to DNA-binding, phosphorylation and redox properties. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3546-3556 (2001).
 24. Martin, C. & Paz-Ares, J. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**, 67-73, doi:S0168952596100494 [pii] (1997).
 25. Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X. & Peterson, T. Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene* **326**, 13-22, doi:S0378111903009053 [pii] (2004).
 26. Kranz, H.D. *et al.* Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 263-276 (1998).
 27. Romero, I. *et al.* More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 273-284 (1998).
 28. Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B. & Grotewold, E. Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**, 427-444 (1999).
 29. Feller, A., Macheiner, K., Braun, E.L. & Grotewold, E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**, 94-116, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x (2011).
 30. Zhang, Y., Cao, G., Qu, L.J. & Gu, H. Involvement of an R2R3-MYB transcription factor gene AtMYB118 in embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **28**, 337-346, doi:10.1007/s00299-008-0644-4 (2009).
 31. Jin, H. & Martin, C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**, 577-585 (1999).
 32. Lu, S.X., Knowles, S.M., Andronis, C., Ong, M.S. & Tobin, E.M. Circadian clock associated and late elongated hypocotyl function synergistically in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **150**, 834-843, doi:pp.108.133272 [pii] 10.1104/pp.108.133272 (2009).
 33. Wykoff, D.D., Grossman, A.R., Weeks, D.P., Usuda, H. & Shimogawara, K. Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15336-15341 (1999).
 34. Yang, T., Perasso, R. & Baroin-Tourancheau, A. Myb genes in ciliates: a common origin with the myb protooncogene? *Protist* **154**, 229-238 (2003).
 35. Myrset, A.H. *et al.* DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J.* **12**, 4625-4633 (1993).
 36. Guehmann, S., Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F. & Moelling, K. Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2279-2286 (1992).
 37. Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Ugalde, U. & Espeso, E.A. The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **75**, 1314-1324, doi:MMI7063 [pii] 10.1111/j.1365-2958.2010.07063.x (2010).
 38. Arratia-Quijada, J., Sánchez, O., Scazzocchio, C. & Aguirre, J. FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation. *Eukaryot Cell* **11**, 1132-1142, doi:EC.00101-12 [pii] 10.1128/EC.00101-12 (2012).
 39. Shen, W., Wieser, J., Adams, T.H. & Ebbole, D.J. The *Neurospora* rca-1 Gene Complements an *Aspergillus* flbD Sporulation mutant but Has No Identifiable Role in *Neurospora* Sporulation. *Genetics* **148**, 1031-1041 (1998).
 40. Lin, Y. *et al.* A putative transcription factor MYT1 is required for female fertility in the ascomycete *Gibberella zeae*.

- PLoS One* **6**, e25586, doi:10.1371/journal.pone.0025586 PONE-D-11-13965 [pii] (2011).
41. Lin, Y. *et al.* A putative transcription factor MYT2 regulates perithecium size in the ascomycete *Gibberella zeae*. *PLoS One* **7**, e37859, doi:10.1371/journal.pone.0037859 PONE-D-12-07207 [pii] (2012).
 42. Pinson, B., Sagot, I., Borne, F., Gabrielsen, O.S. & Daignan-Fornier, B. Mutations in the yeast Myb-like protein Bas1p resulting in discrimination between promoters *in vivo* but not *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3977-3985, doi:gkb647 [pii] (1998).
 43. Pinson, B., Gabrielsen, O.S. & Daignan-Fornier, B. Redox regulation of AMP synthesis in yeast: a role of the Bas1p and Bas2p transcription factors. *Mol. Microbiol.* **36**, 1460-1469, doi:mmi1966 [pii] (2000).
 44. Pinson, B., Brendeford, E.M., Gabrielsen, O.S. & Daignan-Fornier, B. Highly conserved features of DNA binding between two divergent members of the Myb family of transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **29**, 527-535 (2001).
 45. Pinson, B. *et al.* Signaling through regulated transcription factor interaction: mapping of a regulatory interaction domain in the Myb-related Bas1p. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4665-4673 (2000).
 46. Ramsay, R.G. & Gonda, T.J. MYB function in normal and cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 523-534, doi:nrc2439 [pii] 10.1038/nrc2439 (2008).
 47. Ness, S.A. Myb protein specificity: evidence of a context-specific transcription factor code. *Blood Cells Mol. Dis.* **31**, 192-200, doi:S1079979603001517 [pii] (2003).
 48. Miglarese, M.R., Richardson, A.F., Aziz, N. & Bender, T.P. Differential regulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site in the negative regulatory domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 22697-22705 (1996).
 49. Morse, A.M., Whetten, R.W., Dubos, C. & Campbell, M.M. Post-translational modification of an R2R3-MYB transcription factor by a MAP Kinase during xylem development. *New Phytol.* **183**, 1001-1013, doi:NPH2900 [pii] 10.1111/j.1469-8137.2009.02900.x (2009).
 50. Grasser, F.A., LaMontagne, K., Whittaker, L., Stohr, S. & Lipsick, J.S. A highly conserved cysteine in the v-Myb DNA-binding domain is essential for transformation and transcriptional trans-activation. *Oncogene* **7**, 1005-1009 (1992).
 51. Brendeford, E.M., Myrset, A.H., Hegvold, A.B., Lundin, M. & Gabrielsen, O.S. Oncogenic point mutations induce altered conformation, redox sensitivity, and DNA binding in the minimal DNA binding domain of avian myeloblastosis virus v-Myb. *J. Biol. Chem.* **272**, 4436-4443 (1997).
 52. Imamura, S. *et al.* R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12548-12553, doi:0902790106 [pii] 10.1073/pnas.0902790106 (2009).
 53. Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. & Aguirre, J. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1241-1255 (2003).
 54. Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G. & Silar, P. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 982-997 (2004).
 55. Brendeford, E.M., Andersson, K.B. & Gabrielsen, O.S. Nitric oxide (NO) disrupts specific DNA binding of the transcription factor c-Myb *in vitro*. *FEBS Lett.* **425**, 52-56, doi:S0014-5793(98)00196-3 [pii] (1998).
 56. Serpa, V. *et al.* Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 1048-1053, doi:S0006-291X(07)01640-3 [pii] 10.1016/j.bbrc.2007.07.133 (2007).
 57. Heine, G.F., Hernández, J.M. & Grotewold, E. Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 37878-37885, doi:10.1074/jbc.M405166200 M405166200 [pii] (2004).
 58. Ganter, B., Chao, S.T. & Lipsick, J.S. Transcriptional activation by the myb proteins requires a specific local promoter structure. *FEBS Lett.* **460**, 401-410, doi:S0014-5793(99)01373-3 [pii] (1999).