



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“El homólogo de DIP2 en los hongos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* y sus funciones en la diferenciación celular”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Emilio Alonso Martínez Sandoval

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Aguirre Linares
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Otto Geiger
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Ciudad Universitaria. Ciudad de México, febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 Universidad Nacional Autónoma de México.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de los proyectos IN200719 e IV200519 (PAPIIT–UNAM).

Se agradece a los miembros del comité tutor quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo, el cual estuvo conformado por:

Dr. Jesús Aguirre Linares (IFC, UNAM)

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes (IFC, UNAM)

Dr. Otto Geiger (CCG, UNAM)

Se agradece al jurado que fue conformado por:

Presidente Dra. María Alicia González Manjarrez

Vocal Dr. Luis Servín González

Vocal Dra. Rosa Estela Navarro González

Vocal Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg y Torres

Secretario Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Se agradece profundamente a la Bióloga Alma Olivia Sánchez González por el apoyo técnico brindado, a la Unidad de Imagenología del IFC-UNAM, al Dr. Abraham Rosas Arellano y a la Dra. Nallely Cano Domínguez por la ayuda con la microscopía confocal, a las Unidades de Biología Molecular y de Cómputo del IFC-UNAM, así como al Psic. José Fabián Márquez Escalona por su asistencia en el laboratorio.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Perla e Ignacio.

A mi hermano Leonardo.

Tabla de Contenidos

GLOSARIO.....	1
ABREVIATURAS	1
NOTAS SOBRE LOS NOMBRES DE LOS GENES.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Descubrimiento de <i>CPS1</i> y su papel en la virulencia en hongos patógenos	3
2. Trabajos en animales sobre <i>Dip2</i> , ortólogo de <i>cpsA</i>	5
3. CpsA podría participar en el metabolismo secundario y se requiere para la diferenciación celular en dos hongos filamentosos no patógenos.....	9
4. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio de la diferenciación celular	12
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. El RNAm de <i>cpsA</i> se acumula durante el desarrollo de estructuras de reproducción asexual	28
2. La eliminación de <i>cpsA</i> abate la expresión de <i>brlA</i>	29
3. Comprobación de la funcionalidad de la construcción <i>alcA::cpsA::mRFP</i>	31
4. Localización celular de CpsA.....	38
5. Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de CpsA	43
6. Expresión del gen <i>cps-1</i> de <i>N. crassa</i> en <i>A. nidulans</i>	44
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
ANEXOS	57
Anexo 1. Pruebas de especificidad de los oligonucleótidos diseñados para amplificar <i>cpsA</i> y de la pureza del cDNA sintetizado.....	57
Anexo 2. Determinación del gen de referencia más estable para las pruebas de expresión de <i>cpsA</i>	58
Anexo 3. Pruebas de especificidad de los oligonucleótidos para amplificar <i>brlA</i>	59
Anexo 4. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pEM03 y alineamiento de la secuencia de los sitios de empalme de la clonación con la construcción diseñada.	60
Anexo 5. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pTCP1 y alineamiento de la secuencia del sitio de empalme de la región del promotor.	62
REFERENCIAS	64

GLOSARIO

Anastomosis: fusión de hifas

Ascospora: espora sexual

Auxótrofo: requiere determinado suplemento para poder crecer

Conidio: espora asexual que gema de las fiálides

Conidiación: producción de esporas asexuales

Conidióforo: estructura reproductiva asexual

Cleistotecio: cuerpos fructíferos sexuales cerrados

Esterigma: término colectivo para las métulas y las fiálides

Fiálide: esterigmas secundarios que geman de las métulas

Hifa: tubo filamentoso de crecimiento vegetativo

Homotálico: que puede reproducirse sin la necesidad de otro individuo compatible

Métula: esterigmas primarios, que geman de la vesícula del conidióforo

Micelio: conjunto de hifas vegetativas. (Adaptado de Todd *et al.*, 2007)

ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementario

DNA: Ácido desoxirribonucleico

MM: Medio Mínimo

mRFP1: Proteína Roja Fluorescente monomérica

RNA: Ácido ribonucleico

NOTAS SOBRE LOS NOMBRES DE LOS GENES

Este trabajo gira en torno al gen *cpsA* de *Aspergillus nidulans*, mismo al que le asignamos este nombre debido a que es homólogo del gen *CPS1* caracterizado como factor de virulencia en *Cochliobolus heterostrophus* (Lu *et al.*, 2003). Durante la realización de este trabajo se publicó un artículo en el que se asigna el nombre *cpsA* a otro gen de *A. nidulans* (Feng *et al.*, 2017). Sin ignorar dicho artículo, en este trabajo se utilizará el nombre *cpsA* por razones prácticas o, en su defecto, el número AN0842 de bases de datos.

Dependiendo de las reglas de nomenclatura genética, los genes homólogos tienen un nombre distinto en los hongos filamentosos y en este trabajo esto puede generar confusión. Los genes *cpsA*, *MoCps1* y *cps-1* son homólogos del gen caracterizado en *C. heterostrophus* (Lu *et al.*, 2003) y en su conjunto se designarán como “genes *cpsA*”. Por otro lado, Dip2 y sus diferentes homólogos en vertebrados, *Dip2A*, *Dip2B* y *Dip2C*, son un grupo de genes ortólogos de los genes *cpsA* de hongos.

RESUMEN

CPS1 se describió inicialmente como un gen cuya interrupción provoca una disminución en el tamaño de las lesiones infectivas que produce el hongo *Cochliobolus heterostrophus* en las plantas de maíz (Lu *et al.*, 2003). Posteriormente se encontró que los genes homólogos se requieren para la virulencia normal de los hongos *Coccidioides posadasii*, patógeno de mamíferos (Narra *et al.*, 2016) y *Magnaporthe oryzae*, patógeno del arroz (Wang *et al.*, 2016). En los animales existe un grupo de genes que son ortólogos de *CPS1* y que se conocen como *Dip2* y se ha descrito que se requieren para el establecimiento de la polaridad en las estructuras neurales de *Drosophila melanogaster* (Nitta *et al.*, 2017) y *Caenorhabditis elegans* (Noblett *et al.*, 2018). También se ha sugerido que podrían funcionar como receptor de una proteína señalizadora extracelular llamada FSTL1 (Ouchi *et al.*, 2010 y Tanaka *et al.*, 2010) y que algunos procesos de metástasis en el humano están relacionados con un nivel alterado en su expresión (Li *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2017).

En el grupo de trabajo del Dr. Aguirre encontramos que la eliminación del gen homólogo de *CPS1* en los hongos *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*, no patógenos y filogenéticamente distantes entre sí, causa efectos severos tanto en el crecimiento como en la diferenciación sexual y asexual. En ambos organismos, en las cepas mutantes se produce una severa disminución en la producción de las esporas asexuales y de las estructuras sexuales y, en *A. nidulans*, la cepa mutante produce un pigmento café en el medio de cultivo.

Este trabajo tiene el propósito de estudiar la función de *cpsA* en *A. nidulans* y la conservación de esta función. Encontramos niveles muy bajos del RNAm de *cpsA* durante la germinación de los conidios y el crecimiento y un incremento durante la esporulación asexual o conidiación. El gen *cpsA* se requiere para la expresión del gen *brlA*, regulador maestro de la diferenciación asexual, lo cual explicaría la ausencia de conidiación en las mutantes $\Delta cpsA$. Determinamos la localización subcelular de CpsA mediante la sobreexpresión de la proteína etiquetada con mRFP y observamos que ésta se encuentra distribuída en el citoplasma, a lo largo de todas las hifas, y que su localización está asociada con unas estructuras móviles y discretas, muchas de las cuales co-localizan con vacuolas. Finalmente evaluamos la capacidad del gen *cps-1* de *N. crassa* para reemplazar funcionalmente al gen *cpsA* de *A. nidulans* encontrando que *cps-1* es capaz de reemplazar parcialmente a *cpsA*, al rescatar la esporulación a 25 °C, pero no a 37 °C. Nuestros resultados indican que las proteínas CpsA/DIP2 tienen un papel central en la diferenciación celular tanto en los hongos como en los animales.

INTRODUCCIÓN

1. Descubrimiento de *CPS1* y de su papel en la virulencia en los hongos patógenos de plantas y animales

CPS1 como factor de virulencia en *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus victoriae* y *Gibberella zeae*

El gen *CPS1* fue descubierto por el grupo de la Dra. Gillian Turgeon de la Universidad de Cornell, tras el mapeo de un gen afectado en una mutante con virulencia disminuida, proveniente de una biblioteca generada por mutagénesis aleatoria a través de enzimas de restricción (REMI), en el hongo patógeno del maíz *Cochliobolus heterostrophus*. Después de haber evaluado la tasa de crecimiento, la pigmentación, la germinación de las esporas y la formación de las estructuras infectivas, no observaron otra alteración del fenotipo, solo una disminución del 60 % del tamaño de las lesiones infectivas. También obtuvieron y caracterizaron cepas mutantes nulas de *CPS1* en otros hongos patógenos de cereales, *Cochliobolus victoriae* y *Gibberella zeae* (conocido más comúnmente como *Fusarium graminearum*) y encontraron una disminución en la capacidad infectiva de la avena y del trigo respectivamente (**fig. 1**) (Lu *et al.*, 2003).

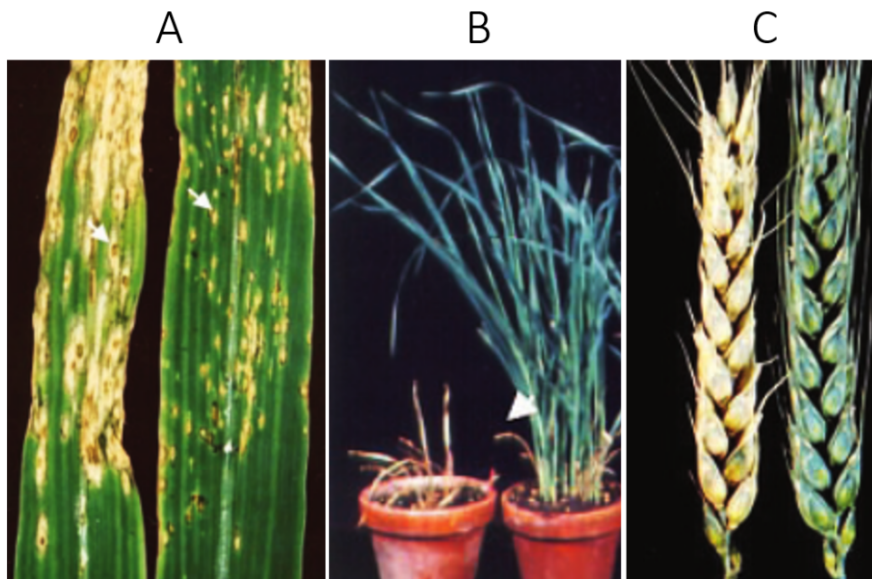


Figura 1. Eliminar *CPS1* afecta la virulencia de dos hongos patógenos de granos. En cada uno de los paneles se muestran a la izquierda plantas infectadas con el hongo fitopatógeno silvestre y a la derecha plantas infectadas con las mutantes $\Delta CPS1$. a) *C. heterostrophus* en maíz b) *C. victoriae* en avena y c) *F. graminearum* contra en trigo. Modificado de Lu *et al.*, 2003).

En ese mismo trabajo mencionan que existen proteínas ortólogas a CPS1 en la mayoría de los hongos (excluyendo al grupo de los basidiomicetos) y en los animales. La proteína está constituida por dos dominios cuya posible actividad enzimática sería la adenilación o activación de sustratos carboxílicos (lípidos o aminoácidos) y que, según sus análisis, podrían relacionarse evolutivamente con enzimas bacterianas que realicen ésta función (Lu *et al.*, 2003).

En *Coccidioides posadasii*, patógeno de mamíferos, la eliminación de CPS1 afecta diversas vías metabólicas y de regulación genética

Con base en el trabajo mencionado, el grupo del Dr. Marc Orbach de la Universidad de Arizona propuso que el gen homólogo podría tener algún papel en la virulencia del hongo *Coccidioides posadasii*, que en el humano causa una micosis conocida como fiebre del Valle. Observaron que la mutante nula produce aproximadamente 10 veces menos esporas que una cepa silvestre, mientras que la morfología de las esporas no se ve alterada. Notaron además la formación de un pigmento verde en el medio alrededor de la colonia de la mutante y que ésta presenta mayor resistencia que la cepa silvestre al peróxido de hidrógeno (Narra *et al.*, 2016). Los ratones expuestos a esporas de la cepa mutante CPS1 no contraen la micosis, lo cual contrasta con el efecto de las esporas de la cepa silvestre, que resulta en la muerte en un plazo de aproximadamente 19 días. Además, los ratones previamente expuestos a la cepa mutante quedan inmunizados al hongo patógeno y sobreviven a exposición con esporas de la cepa silvestre (Narra *et al.*, 2016).

A partir de un análisis transcriptómico global por RNA-seq encontraron cambios importantes en la expresión de 33 genes, agrupados en las categorías: síntesis de coenzima A, piruvato deshidrogenasa, cinasas y fosfatasa, adhesión celular, conidiación, respiración celular, heat shock proteins y transportadores. Proponen que la eliminación de CPS1 tiene un impacto pleiotrópico en múltiples vías tanto reguladoras como metabólicas. Enfatizan que lo poco que se sabe no explica la falta de virulencia observada en los ratones expuestos a la cepa sin CPS1 (Narra *et al.*, 2016).

En *Magnaporthe oryzae*, patógeno del arroz, el gen MoCps1 está involucrado en la formación de estructuras asexuales

Wang *et al.* (2016), de la China Agricultural University en Beijing, aislaron una mutante de *Magnaporthe oryzae* con conidiación disminuída, de una biblioteca generada por mutagénesis insercional por transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) y al mapear el sitio de inserción encontraron que se trataba de un gen homólogo a CPS1 de *C. heterostrophus* y por lo tanto lo nombraron MoCps1. En este trabajo observaron una disminución pronunciada de la conidiación en la cepa mutante nula, debida a que los conidióforos producen una menor cantidad de conidios (**fig. 2**). También notaron que las esporas presentan una morfología alargada y que la

mutante produce menos lesiones, mismas que crecen más lentamente en comparación con la cepa silvestre. La cepa mutante además es sensible a agentes desestabilizadores de la pared celular, pero no mostró diferencias en el crecimiento en medios con diferentes ácidos grasos como fuente de carbono.

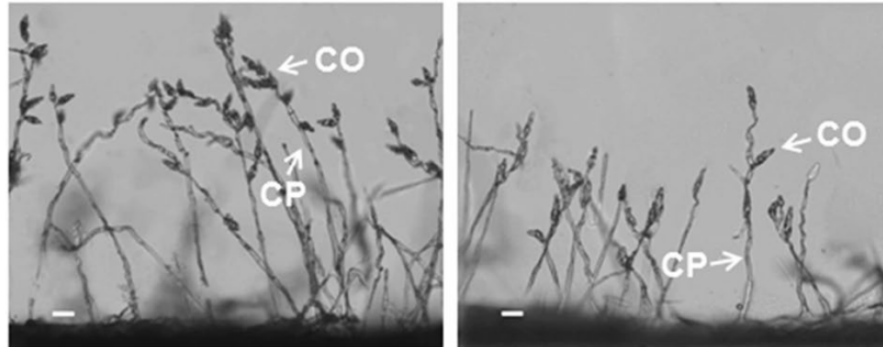


Figura 2. *MoCps1* es necesaria para la formación de un conidióforo normal. Fotografía lateral de conidióforos de la cepa silvestre (izquierda) y la cepa $\Delta MoCps1$ (derecha). Se muestra que la mutación no afecta la cantidad de conidióforos producidos, pero sí provoca que estos produzcan una cantidad menor de conidios con una morfología alargada. Modificado de Wang *et al.* (2016).

Por medio de qRT-PCR encontraron que los apresorios maduros (estructuras infectivas) muestran los niveles más altos de expresión de *MoCps1* y que los conidios tienen niveles relativamente más altos de expresión que las hifas vegetativas. También observaron que eliminar *MoCps1* provoca cambios en la expresión de 10 genes relacionados con la conidiogénesis (Wang *et al.*, 2016). Asimismo, mencionan que se requiere saber si los genes *CPS1* también se involucran en la conidiogénesis en otros hongos, que este gen podría participar en algunos procesos de regulación positiva o negativa de los genes cuya expresión miden y que no hay reportes sobre los mecanismos moleculares de las proteínas CPS1 en hongos filamentosos (Wang *et al.*, 2016).

2. Trabajos en animales sobre *Dip2*, ortólogo de *cpsA*

Un análisis tipo Blast de *cpsA* en las bases de datos de animales, detecta genes homólogos conocidos como *Dip2*. Aunque *cpsA* y *Dip2* muestran un grado considerable de divergencia, las proteínas codificadas por éstos genes son de tamaños similares (cerca de 1900 aminoácidos) y en todas se identifican dos dominios similares en secuencia a un grupo de CoA ligasas de ácidos grasos presentes en bacterias (Lu *et al.*, 2003), de lo cual se hablará más adelante. En *D. melanogaster* y *C. elegans* existe un solo gen *Dip2*, mientras que en animales vertebrados existen tres homólogos que se designan como *Dip2A*, *Dip2B* y *Dip2C* (fig. 3). El hecho de que *Dip2* y *cpsA* sean ortólogos no ha sido abordado funcionalmente en ninguno de los estudios realizados en animales.

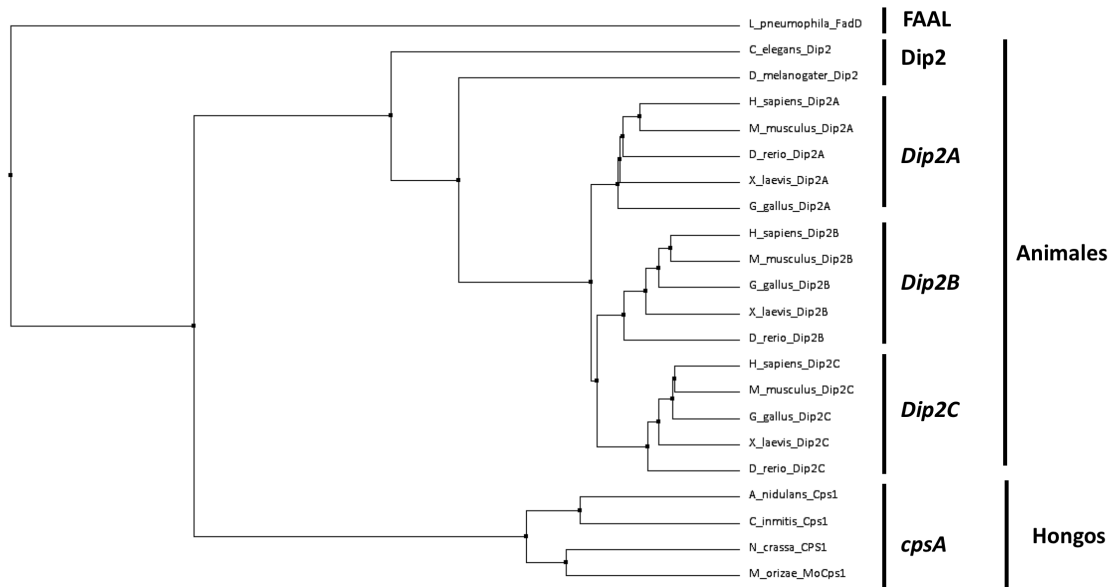


Figura 3. En animales hay de uno a tres homólogos de los genes *Dip2*, ortólogos de los genes *cpsA* de hongos. El árbol se realizó por medio del algoritmo de distancia media utilizando PAM 250 en el programa Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) utilizando un alineamiento múltiple realizado en el servidor T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000), de las secuencias de aminoácidos predichas por los genes *cpsA* y *dip2* encontradas por Blast en la base de datos del NCBI (Sayers *et al.*, 2019) y por búsqueda en el UniProt (The UniProt Consortium, 2018) usando como raíz del árbol la secuencia de aminoácidos codificada por FadD, que es una CoA ligasa de ácidos grasos similar en secuencia a los dominios de adenilación presentes en las proteínas Dip2/CpsA.

DIP2 en el desarrollo del sistema nervioso en *D. melanogaster* y *C. elegans*

El grupo del Dr. Tetsuya Tabata de la Universidad de Tokio estudia el desarrollo de los sistemas neuronales en *D. melanogaster* (<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/en/lab/tabata/>) y uno de sus principales modelos es un conjunto de neuronas conocido como “mushroom body” (MB), que tiene un número reducido de axones mismos que se ramifican en un patrón sencillo (fig. 4, panel A’). En 2016 publicaron un trabajo en el que reportan que, como resultado de un escrutinio por RNAi para encontrar los genes relacionados con el desarrollo del MB, encontraron que el knockdown de *DIP2* provoca un aumento en el número de lóbulos, así como un direccionamiento incorrecto de los mismos en dicha estructura (fig. 4, panel B y B’). También reportaron la localización de DIP2 principalmente en la membrana plasmática, ligeramente en el citoplasma y no en el núcleo. Basados en la presencia de dos dominios con posible actividad enzimática de activación de ácidos grasos por adenilación, sugieren que *Dip2* podría regular el desarrollo neuronal por medio de la regulación del metabolismo de ácidos grasos (Nitta *et al.*, 2017).

En la Universidad de Ottawa, el grupo del Dr. Antonio Colavita utiliza *C. elegans* como organismo modelo para estudiar los mecanismos que permiten que las neuronas adquieran y mantengan las formas polarizadas y ramificadas que las distinguen (<https://www.uottawa.ca/brain/people/colavita-antonio>). En el 2018 este grupo publicó un trabajo en el que se secuenció el genoma de una mutante previamente obtenida por mutagénesis química que tiene una morfología aberrante de las neuronas motoras y se encontró que estaba afectada en *dip-2*. Observaron que las mutantes con pérdida de función de *dip-2* tienen un incremento progresivo en brotes y ramificaciones de las neuritas tanto en larvas como en organismos adultos (fig. 4, paneles C y C'). También observan que *dip-2* inhibe los estadios tempranos de la regeneración de los axones tras daño mecánico. Determinaron que DIP-2 se localiza en el citoplasma en neuronas, mientras que en células de la epidermis se localiza en la membrana. Fuera de los defectos en la formación del sistema nervioso, el único fenotipo obvio que encuentran es que los gusanos mutantes tienen un defecto en la puesta de huevos y se muestran normales tanto como el crecimiento como el movimiento (Noblett *et al.*, 2018).

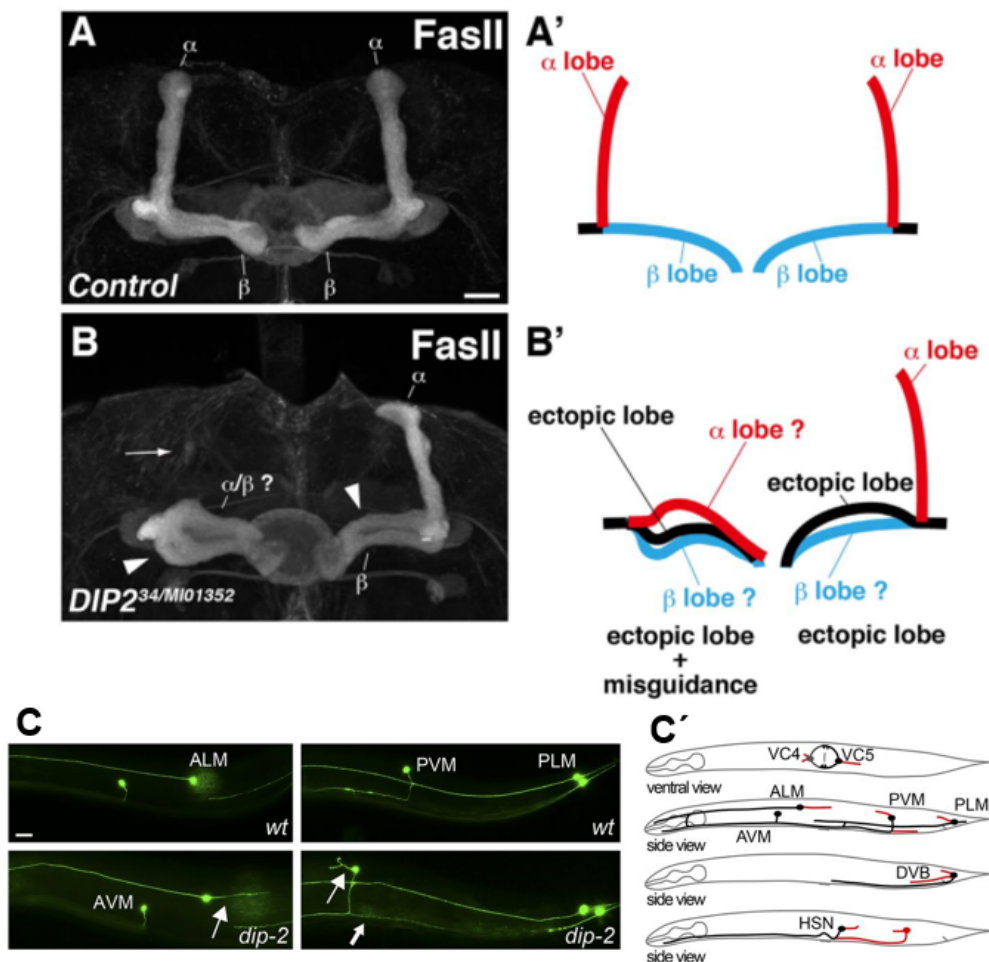


Figura 4. La mutación de *DIP2* en *Drosophila melanogaster* y de *dip-2* en *Caenorhabditis elegans* afecta el desarrollo neuronal. En el panel A se muestra la estructura neuronal del cerebro de *Drosophila* conocida como “Mushroom Body” y en A’ se muestra esquematizado el arreglo silvestre de los lóbulos al interior de ésta. En el panel B y B’ se muestra el efecto fenotípico de que tiene la cancelación de *DIP2* en esta estructura, que consiste básicamente en la formación de lóbulos ectópicos y en un direccionamiento incorrecto de los mismos. Modificado de Nitta *et al.* (2017). En el panel C se muestran las neuronas mecanosensoras de una cepa silvestre (wt) y de gusanos mutantes en *dip2*. De forma similar a lo que ocurre en *Drosophila*, la mutación resulta en lóbulos ectópicos y un direccionamiento incorrecto, como se esquematiza con las líneas rojas en el panel C’ (modificado de Noblett *et al.*, 2018).

Otras funciones de Dip2 en animales

En la Universidad de Boston, el grupo del Dr. Kenneth Walsh se dedica a estudiar mecanismos de señalización que controlan el crecimiento de los tejidos del sistema cardiovascular. En el 2008 este grupo publicó el hallazgo de que la glicoproteína extracelular FSTL1 es secretada por las células musculares e induce la revascularización en tejido isquémico (Ouchi *et al.*, 2008). Debido a esto, el grupo se dispuso a identificar al receptor de la FSTL1. Para esto, hicieron ensayos de inmunoprecipitación y encontraron a DIP2A en la fracción membranal de las células endoteliales como una proteína que interactúa con FSTL1 etiquetada con FLAG. Posteriormente confirmaron el resultado haciendo ensayos de coinmunoprecipitación. Una observación que hicieron es que los programas que predicen la presencia de dominios transmembranales muestran datos muy heterogéneos y que esto lleva a una incertidumbre considerable acerca de la topología de DIP2A (Ouchi *et al.*, 2010). En un trabajo publicado poco después por investigadores de diferentes universidades de Japón (Tanaka *et al.*, 2010) mencionan que la interacción entre FSTL1 y DIP2A no es específica ya que FSTL1 se une a otras proteínas de la superfamilia del TGF- β (a CD14, a folistatina, a activina, a TGF- β 1, al BMP-2, al BMP-4, al receptor de la activina y al TGF- β RII), al igual que lo hace DIP2A (TGF- β 1 y BMP-4).

En el ser humano, *Dip2C* se vincula con procesos de metástasis celular. En un trabajo reciente (Li *et al.*, 2017) se investigó la expresión del gen *DIP2C* en tejidos y líneas celulares de cáncer mamario. Los autores encontraron que *DIP2C* podría tener un papel como supresor de tumores ya que los pacientes con una forma grave de cáncer mamario presentan un nivel más bajo de expresión de *DIP2C* que aquellos con una forma menos severa de la enfermedad y a que los pacientes con niveles mayores de expresión de *DIP2C* tienen una tasa de sobrevivencia mayor en comparación con los grupos que tienen una expresión relativamente baja. En otro trabajo Larsson *et al.* (2017) caracterizaron los efectos de realizar la cancelación del gen *DIP2C* en una línea de cáncer colorectal. Encontraron que esto provoca una disminución del 50 % en la capacidad de formar colonias, una reducción de cerca del 40 % en la tasa de crecimiento, el cambio a una morfología celular más alargada, así como un incremento en la velocidad de cerrado de heridas. También encontraron que el knockout de *DIP2C* afecta los niveles de expresión de 780 genes

incluyendo algunos relacionados con actividad supresora de tumores y con la transición epitelio-mesénquima.

Mientras que en animales se ha intentado entender con diversos enfoques las funciones de *dip2*, en los hongos el papel de los genes *cpsA* se ha relacionado principalmente con la virulencia. Con esto en mente, resulta importante estudiar la función de *cps1* en hongos no patógenos y abordar la conservación de sus funciones.

3. CpsA puede participar en el metabolismo secundario y se requiere para la diferenciación celular en dos hongos filamentosos no patógenos

En la secuencia proteica codificada del gen *cpsA* existen dos dominios muy parecidos a los dominios activadores de sustratos carboxílicos presentes en proteínas que producen una parte importante de los metabolitos secundarios en los hongos, las policétido sintetasas (PKS) y sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Lu *et al.*, 2003). Las PKS de tipo I y las NRPS son enzimas muy grandes formadas por unidades funcionales conocidas como módulos, cada uno con dominios con diferentes actividades enzimáticas, que transforman sus sustratos de manera secuencial, como una línea de ensamblaje, produciendo una diversidad muy amplia de metabolitos secundarios (Naughton *et al.*, 2017).

Los policétidos y péptidos sintetizados por las PKS y NRPS tienen múltiples funciones biológicas en los hongos. Por ejemplo, el pigmento de las esporas asexuales de *A. nidulans* derivado del heptacétido naptotirona, es sintetizado por la PKS WA1, tiene una función como quelante de especies reactivas del oxígeno y confiere resistencia a la radiación UV (Klejnstrup *et al.*, 2012). Por otro lado, SidC es una NRPS responsable de la formación del hexapéptido presente en la ferricocina, un sideróforo necesario para el almacenamiento intracelular de hierro y cuya ausencia ocasiona la sobreexpresión de enzimas antioxidantes y una conidiación disminuida (Eisendle *et al.*, 2003).

En el laboratorio del Dr. Jesús Aguirre se encontró al gen *cpsA* del hongo *Aspergillus nidulans*, como resultado del interés por entender el metabolismo secundario y las señales químicas que regulan la esporulación asexual. Haciendo un análisis bioinformático se buscaron genes que codificaran dominios similares a los que contienen las NRPS, y se encontró que el gen *cpsA* contiene dos dominios continuos de adenilación. Pensando en una posible relación entre *cpsA* y el metabolismo secundario se obtuvo la mutante nula.

Eliminar *cpsA* en *A. nidulans* lleva a un fenotipo muy drástico. Las mutantes muestran una reducción casi total en la conidiación y la incapacidad de desarrollar estructuras sexuales (**fig. 5, panel superior**). Además, forman un pigmento oscuro que es secretado al medio, lo que sugiere que las mutantes tienen un desbalance relacionado con el metabolismo del pigmento. Otros fenotipos que se observaron son defectos en la morfología de las hifas y sensibilidad elevada a agentes desestabilizadores de la pared celular (Angoa *et al.*, 2015).

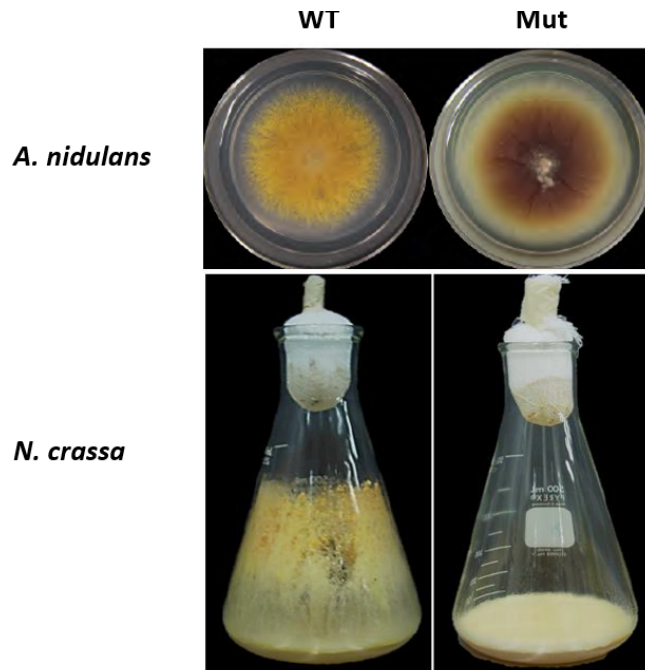


Figura 5. Fenotipo general de las mutantes $\Delta cpsA/\Delta cps-1$ en *A. nidulans* y *N. crassa*, respectivamente. Fotografías superiores, una colonia de la cepa silvestre (WT) de *A. nidulans* muestra una coloración amarilla que corresponde a la coloración de los conidios, mientras que la mutante carente del gen *cpsA* (derecha) no tiene esta coloración porque no produce conidios y en cambio se observa una coloración marrón atípica del micelio. Fotografías inferiores, una cepa silvestre (izquierda) de *N. crassa* muestra un crecimiento aéreo muy pronunciado que se observa en la imagen como micelio creciendo sobre las paredes del matraz, mientras que la cepa mutante (derecha) prácticamente no produce micelio aéreo ni conidios.

En el laboratorio además de trabajar con *A. nidulans*, trabajamos con *N. crassa*. Ambos organismos son saprobios (se alimentan de materia orgánica en descomposición), y en particular *N. crassa* se encuentra en la naturaleza después de incendios forestales, creciendo sobre la materia orgánica quemada (Rashmi *et al.*, 2003). Filogenéticamente, *A. nidulans* pertenece a la clase Eurotiomicetos y *N. crassa* a la clase Sordariomicetos. La divergencia entre ambos hongos ocurrió hace al menos 320 millones de años (Taylor y Ellison, 2010; **fig. 6**). Algunas diferencias centrales en su historia de vida son que *A. nidulans* produce sus esporas sexuales en una estructura cerrada (cleistotecio) mientras que *N. crassa* produce en una estructura con forma de pera o matraz con una apertura en la parte superior (peritecio); que las hifas de *N. crassa* son mucho más grandes y crecen a mayor velocidad que las de *A. nidulans* y que la reproducción asexual de *A. nidulans* requiere de la formación de un conidióforo desarrollado con diferentes sub-estructuras, mientras que en *N. crassa* la formación de conidios ocurre por constricción de hifas aéreas, como se esquematiza en la **fig. 6**.

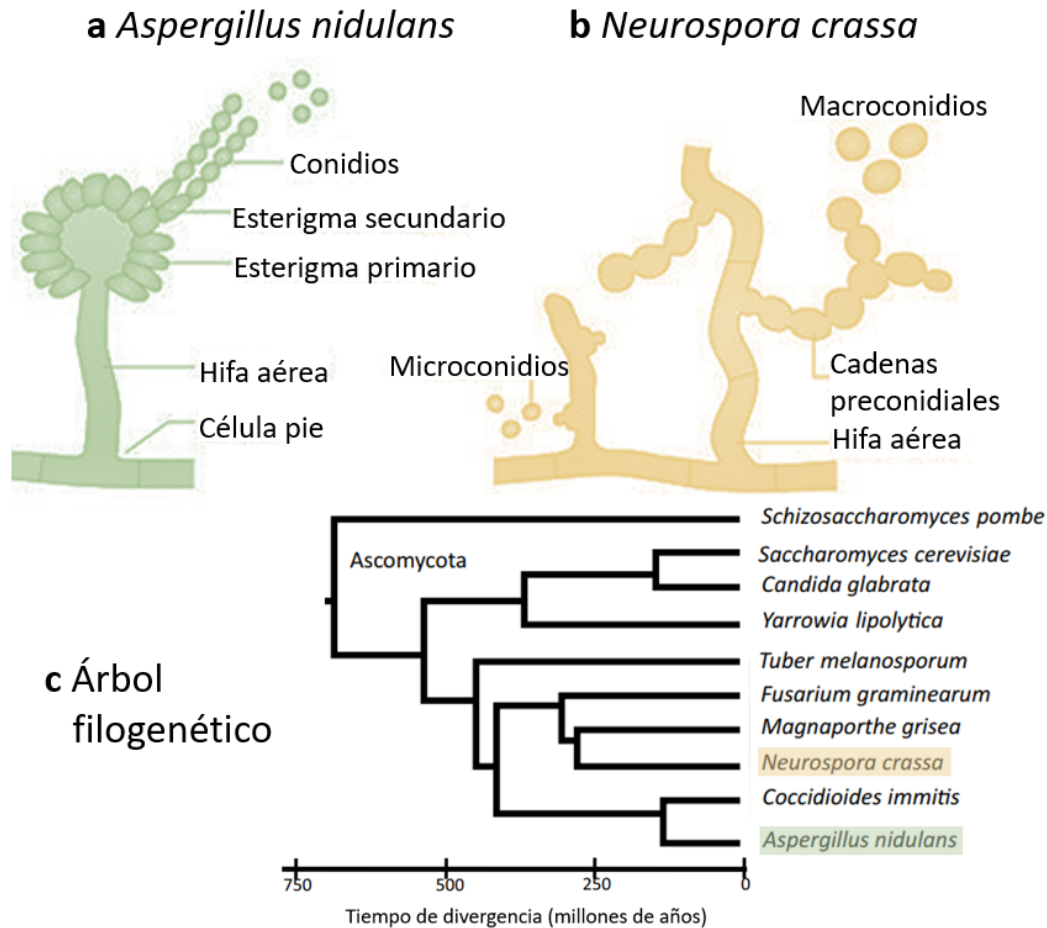


Figura 6. Estrategias de reproducción asexual en *A. nidulans* y *N. crassa* (a y b) y distribución filogenética (c). La generación de conidios en *A. nidulans* requiere de la formación de un conidióforo elaborado que consiste en células diferenciadas con diferentes funciones: célula pie que da soporte al conidióforo, hifas aéreas que se alargan por encima del sustrato y cuya parte apical se conoce como vesícula, esterigmas primarios que reciben el nombre de métulas, esterigmas secundarios llamados fiálides y finalmente cadenas largas de conidios (a). Los conidióforos de *N. crassa* son más sencillos y consisten en constricciones de micelio aéreo que se eleva sobre el sustrato de crecimiento (B) (Imagen modificada de Leeder *et al.*, 2011). En (c) se muestra un árbol filogenético de la distribución de *A. nidulans* y *N. crassa* dentro del clado de los ascomicetos, con una escala en millones de años del tiempo estimado de divergencia (Modificado de Taylor y Ellison, 2010).

El fenotipo drástico resultante de eliminar *cpsA* en *A. nidulans* nos llevó a obtener la mutante *cps-1* en *N. crassa*. Con la eliminación del gen homólogo *cps-1*, observamos una disminución importante en la velocidad del crecimiento lineal, así como una casi nula capacidad de formar micelio aéreo (fig. 5), lo cual va acompañado de una disminución mayor al 90 % en el número de conidios producidos. Otro fenotipo observado fue la incapacidad para producir estructuras sexuales femeninas, que en *N. crassa* se conocen como protoperitecios (Martínez, 2017).

Estos resultados nos indican que en ambos organismos la proteína tiene funciones centrales en el desarrollo. Habiendo mostrado esto, queda como interrogante si existe una conservación en la función de estas proteínas en *A. nidulans* y *N. crassa*, es decir, saber si podrían ser funcionalmente intercambiables. Para ello, decidimos centrarnos en *Aspergillus nidulans*, que a continuación se describe como organismo modelo.

4. *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio de la diferenciación celular

A. nidulans es un hongo ascomiceto filamentoso, aerobio obligado, que posee múltiples características que lo hacen un buen modelo experimental para estudiar procesos de diferenciación celular y de desarrollo. Es de fácil manipulación genética y se puede transformar con DNA recombinante de manera homóloga y heteróloga. Tiene una diversidad metabólica amplia lo que permite el estudio de procesos catabólicos y biosintéticos. Crece rápidamente produciendo una gran cantidad de biomasa, permitiendo pruebas rápidas de crecimiento. Además, forma colonias en medio sólido, lo que permite el análisis de múltiples colonias en una sola caja Petri. Posee múltiples marcadores de selección lo que es conveniente en estudios de genética clásica y molecular. También produce conidios uninucleados, lo cual permite la propagación clonal y la purificación de mutantes, transformantes y progenie a partir de cruces (Todd *et al.*, 2007). Además su genoma está completamente secuenciado y está disponible en internet (<http://www.aspergillusgenome.org/>).

El hongo presenta crecimiento vegetativo y dos programas de desarrollo y diferenciación: sexual y asexual (**fig. 7**). El crecimiento vegetativo inicia con la germinación de una espora asexual (conidio) o sexual (ascospora), cuyo crecimiento genera una red de hifas interconectadas que forman el micelio. El micelio es generalmente haploide pero las hifas pueden fusionarse en un proceso llamado anastomosis, dando origen a un micelio heterocariótico en el caso de que los individuos que se fusionen tengan diferentes genotipos (Yu *et al.*, 2006). Después de un periodo de crecimiento aproximado de 16 h tras la germinación de las esporas, ocurre un proceso de diferenciación de hifas al interior de las colonias, en el que se forman hifas aéreas al centro de la colonia, de las cuales algunas se diferencian en conidióforos (Adams *et al.*, 1998).

El programa de diferenciación asexual se inicia a partir del micelio vegetativo con la formación de una célula alargada llamada tallo que se ancla al medio con una célula pie. El tallo se alarga por extensión apical, de forma similar al crecimiento de hifas vegetativa, a una altura cercana a los 100 μ M. Después de que se detiene el crecimiento del tallo, su punta comienza a hincharse formando la estructura conocida como vesícula. En la superficie de la vesícula ocurren de manera simultánea múltiples procesos de gemación formando una capa de aproximadamente 60 esterigmas primarios llamados métulas. Las métulas tienen dos procesos de gemación produciendo una capa

de cerca de 120 esterigmas secundarios uninucleados llamados fiálides. Las fiálides dan origen a cadenas de esporas uninucleadas llamadas conidios. Cada fialide puede producir más de 100 esporas, de modo que el número de conidios producido por conidióforo probablemente exceda los 10,000 (Adams *et al.*, 1998).

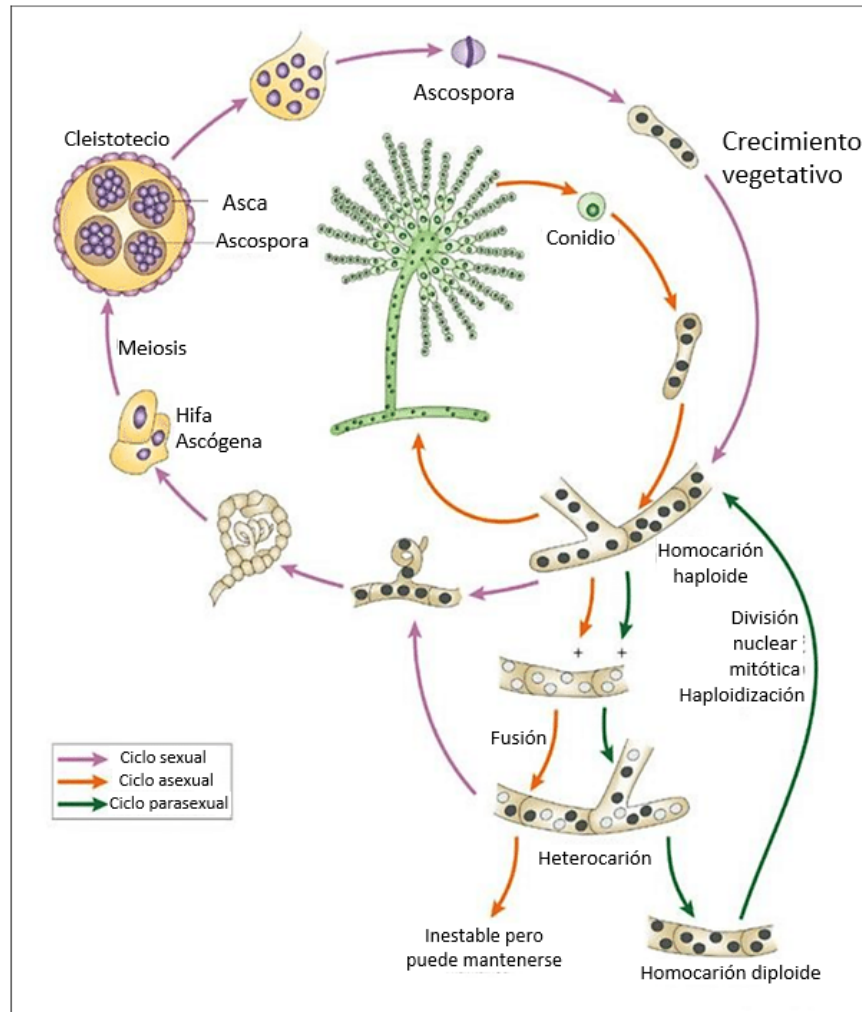


Figura 7. Ciclo de vida de *A. nidulans*. El ciclo de vida de *A. nidulans* se constituye por el crecimiento vegetativo y dos grandes programas de diferenciación: el asexual, que se señala con flechas rojas en la imagen y que culmina con la formación del conidióforo y el sexual, que se señala con flechas lilas y que culmina con la formación de los cleistotecios. El crecimiento vegetativo resulta en la formación de un entramado de hifas llamado micelio, en el cual ocurre un primer evento de diferenciación con la formación del micelio aéreo seguido del programa de diferenciación asexual. Modificado de Al-Saigh (2013)

El programa de diferenciación sexual de *A. nidulans* es un proceso altamente complejo que comienza después de la diferenciación de los conidióforos y que culmina en la formación de cuerpos fructíferos con un diámetro de 125-200 μm de diámetro que llaman cleistotecios. *A. nidulans* es homotálico lo cual significa que puede tener desarrollo sexual sin la necesidad de

cruzarse con una pareja compatible, pero también puede ser heterotálico y por lo tanto cruzarse. El desarrollo sexual es influido por señales tanto ambientales como intrínsecas. El proceso de desarrollo sexual ocurre después de 40-50 h de cultivo a 37 °C en el centro de la colonia y los cleistotecios maduros se pueden encontrar después de aproximadamente 96h. El proceso inicia con la fusión de un par de hifas lo que origina un dicarion. Estas hifas son morfológicamente similares y por lo tanto no se puede diferenciar entre células femeninas y masculinas. Tras esta fusión, alrededor comienzan a crecer hifas de manera desordenada, formando un nido altamente empaquetado. Alrededor de éste comienzan a diferenciarse células globosas y multinucleadas conocidas como células Hülle, que tienen el papel de proveer protección y nutrición. Las hifas que rodean el “nido” se diferencian posteriormente en la envoltura del cleistotecio, dentro del cual se diferencian una red de hifas ascógenas (Pöggeler, Nowrousian y Kück, 2006). Dentro de las últimas ramificaciones de las hifas dicarióticas, que representan a las ascas jóvenes, ocurren eventos de fusión nuclear. Esto es inmediatamente seguido por una meiosis y una mitosis postmeiótica, resultando en ocho núcleos. Estos núcleos se separan uno de otro por membranas, dando origen a 8 esporas con pigmento rojo en cada una de las 10,000 ascas en cada cuerpo fructífero. Una segunda mitosis postmeiótica hace que las ascosporas sean binucleadas (Krijgheld *et al.*, 2013).

A. nidulans es un modelo particularmente útil para estudios de biología celular y regulación génica. La investigación usando este modelo ha contribuido bastante a nuestro conocimiento de una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo descubrimientos iniciales sobre la recombinación, el desarrollo de esporas, el ciclo celular, la polaridad celular, la reparación del DNA, el metabolismo secundario, la señalización y el control del pH (Todd *et al.*, 2007).

Como se describió previamente, eliminar *cpsA* abate drásticamente la conidiación. En *A. nidulans* el programa de desarrollo asexual que se explicó en este apartado y que culmina con la formación de esporas asexuales o conidios, es regulado de manera central por un solo gen, *brlA*.

El gen *brlA* y su regulación por señales esporogénicas

brlA es un factor transcripcional con dedos de zinc C₂H₂ que induce la expresión de otros genes requeridos para el desarrollo asexual. Las mutantes de pérdida de función forman los tallos de los conidióforos, que crecen indeterminadamente y no son capaces de producir los otros tipos celulares requeridos para la esporulación. Por otro lado, la sobreexpresión de *brlA* en células que están en crecimiento vegetativo provoca la interrupción del crecimiento polar y el inicio de una conidiación anormal que lleva a la formación de esporas viables a partir de hifas. Ninguna señal ambiental ha mostrado ser capaz de saltarse la necesidad de BrlA en la conidiación y diversos trabajos han mostrado que la activación de la expresión de *brlA* en el desarrollo del conidióforo es un paso esencial y central para la formación de los conidios. El locus *brlA* consiste en dos unidades transcripcionales sobrelapadas llamadas *brlA α* y *brlA β* , las cuales parecen ser reguladas por diferentes mecanismos y distintos estímulos ambientales (Yu *et al.*, 2006).

Diversas condiciones ambientales y factores endógenos inducen una acumulación de transcritos de *brlA* en *A. nidulans*, lo cual va acompañado con el proceso de conidiación (Adams *et al.*, 1998). Ejemplos de factores ambientales son la exposición al aire, que se utiliza como un método de inducción de la conidiación simultánea tras el cultivo en medio líquido (Timberlake *et al.*, 1987) y la privación de nutrientes, con la cual se observa la capacidad de formar conidióforos en cultivos sumergidos (Skromne *et al.*, 1995). La mayoría de los factores endógenos estudiados que inducen la conidiación en *A. nidulans* son derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, las oxilipinas son ácidos grasos oxidados por las dioxigenasas PpoA y PpoC y que median el balance entre el desarrollo sexual y el desarrollo asexual (Tsitsigiannis *et al.*, 2004). Otra señal intrínseca desconocida se realiza de manera dependiente de la proteína AfeA, cuya eliminación resulta en una disminución en la actividad del promotor de *brlA* y de la conidiación, mientras que su sobreexpresión induce la formación de un conidio en la parte terminal de las hifas, de manera similar a lo que ocurre al sobreexpresar *brlA* en células vegetativas (Adams *et al.*, 1988). Dentro de la secuencia codificante de AfeA se encuentra un dominio de adenilación y se ha sugerido que su sustrato podría ser un ácido graso (Soid-Raggi *et al.*, 2016).

El fenotipo de la mutante *cpsA* en *A. nidulans* y la presencia de los dominios de adenilación nos hacen pensar que CpsA podría participar en la biosíntesis de un factor esporogénico, o que la mutación podría generar un desbalance en los lípidos intracelulares que desencadene un desbalance en las vías de síntesis de los factores mencionados. Por un lado, la mutante $\Delta cpsA$ es incapaz de esporular, efecto que también se observa como resultado de la mutación de genes involucrados en la síntesis de factores esporogénicos y también secreta un pigmento café al medio (al igual que la mutante en *Coccidioides posadasii* (Narra *et al.*, 2016)), lo cual sugiere la acumulación anormal de algún metabolito. Por otro lado, en *cpsA* se predice la presencia de dominios de adenilación que podrían tener actividad enzimática de activación de ácidos grasos y como se describió en el párrafo anterior, múltiples factores esporogénicos son derivados de ácidos grasos.

Tanto PpoA (Tsitsigiannis *et al.*, 2004) como AfeA (Soid-Raggi *et al.*, 2016) se localizan subcelularmente en cuerpos lipídicos, los cuales son ensamblajes macromoleculares proteolipídicos que contienen lípidos neutrales de almacenamiento y que participan en la biogénesis, tráfico, movilización y en el metabolismo de éstos. En los hongos se encuentran durante la formación de estructuras reproductivas (Adams *et al.*, 1988). Hasta el momento no se conoce la localización subcelular de las proteínas CpsA en los hongos filamentosos.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe poco sobre las funciones de la proteína CpsA a nivel celular, o sobre la conservación de su función en los hongos ascomicetos. En este trabajo nos propusimos determinar los niveles de expresión de este gen en diferentes momentos del desarrollo, los efectos de su eliminación en la expresión del gen regulador *brlA*, la localización de la proteína a nivel subcelular, los efectos de su sobreexpresión y la complementación de mutantes de *A. nidulans* con el gen de *N. crassa*.

OBJETIVO GENERAL

Entender cómo el gen *cpsA* regula distintos procesos morfogénicos y explorar la posible conservación en la función de la proteína correspondiente en dos hongos pertenecientes a diferentes clases.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la expresión del gen *cpsA* en diferentes momentos del desarrollo.
2. Establecer el efecto de la eliminación de *cpsA* sobre la expresión del gen *brlA*, regulador maestro de la conidiación.
3. Definir cuál es la localización celular de la proteína CpsA en diferentes momentos del desarrollo.
4. Determinar los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de *cpsA* sobre el crecimiento y la diferenciación asexual.
5. Determinar si los homólogos *cpsA* de *A. nidulans* y *N. crassa* son funcionalmente intercambiables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas empleadas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *A. nidulans* que se emplearon en este trabajo (Tabla 1) se cultivaron a 37 °C en medio mínimo con los suplementos correspondientes (Hill y Kafer, 2001). Para la preparación de medios sólidos se añadió agar al 1.25 % y los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura en agitación a 300 rpm.

Tabla 1: Cepas usadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	Kawasaki, Sánchez y Aguirre (2002)
11035	<i>pyrG89, pyroA4, ΔnkuA::argB, riboB2, veA1^a</i>	Nayak <i>et al.</i> (2006)
RMS011	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801</i>	Stringer, Dean, Sewall y Timberlake (1991)
Δ0842-4 (Δ <i>cpsA</i>)	<i>pyrG89, pyroA4, riboB2, ΔnkuA::argB, veA1, Δan0842::riboBAf</i>	D
CAG2 (Δ <i>cpsA</i>)	<i>pabaA1, yA2, Δan0842::riboBAf, veA1^b</i>	E
cEM03	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801, argB::alcA(p)::an0842::mRFP</i>	Este trabajo. RMS011 transformada con pEM03
cEM04	<i>pabaA1, yA2, veA1, Δan0842::riboBAf, argB::alcA(p)::an0842::mRFP^c</i>	Este trabajo. Progenie de Δ0842-4 X cEM03
cEM06	<i>pabaA1, yA2, veA1, Δan0842::riboBAf, argB::alcA(p)::an0842::mRFP^c</i>	Este trabajo. Progenie de Δ0842-4 X cEM03
cEM08 a cEM13	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB, veA1, trpC801, argB::alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP</i>	Este trabajo. RMS011 transformada X pEM05
cEM14 a cEM16	<i>pabaA1, yA2; veA1, Δan0842::riboBAf, argB::alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP^f</i>	Este trabajo. Progenie de cEM08 x Δ0842-4

^a Genotipo parcial. También puede contener *argB2*

^b Genotipo parcial. También puede contener *riboB2*

^c Genotipo parcial. También puede contener *riboB2* y *ΔargB::trpCΔB* con *trpC801*

D y E: Estas cepas fueron generadas en el laboratorio por J. L. Ramos y por A. K. Gómez respectivamente

^f Genotipo parcial. Puede o no contener *ΔnkuA*.

Para los cultivos conidiantes se recolectaron esporas de cultivos de 5 días y se lavaron con agua tres veces en una centrífuga clínica. Con estas esporas se inocularon los cultivos a una densidad de 5×10^5 esporas/mL. Los cultivos se incubaron 18 h en un agitador rotatorio a 300 rpm. Para inducir la conidiación, se filtraron porciones del cultivo con una bomba de vacío y se expusieron al

aire sobre papel filtro circular Whatman No. 1 de 10 cm de diámetro (Aguirre, 1993). Los papeles con el micelio adherido se transfirieron a charolas con medio sólido con los suplementos correspondientes cubiertas con papel aluminio de modo que hubiera circulación de aire hacia el cultivo y se incubaron a 37 °C por el tiempo indicado en cada experimento.

Cuantificación de la producción de esporas/cm²

Se inocularon 1×10^4 esporas de la cepa correspondiente en el centro de cajas Petri con medio mínimo más suplementos y se incubaron a 37 °C por 5 días, después de lo cual se midió el diámetro y se determinó el área de cada colonia. El total de esporas de cada colonia se colectó con un hisopo en 10 mL agua estéril, repitiendo la extracción hasta que la colonia no liberara más esporas. El total de esporas colectadas se concentraron en un volumen final de 1 mL y se cuantificaron haciendo las diluciones necesarias con agua y contando visualmente con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de un cultivo de micelio de 18 h, obtenido de la inoculación de esporas en medio líquido sobre cajas Petri y sin agitación. En estas condiciones se forma una película de micelio que se colectó con pinzas, se secó en papel absorbente y se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL, después de lo cual se les adicionó un balín de metal de 5 mm haciendo uso del dispensador de TissueLyser. Las muestras se congelaron en un refrigerador horizontal a -80 °C por una hora y posteriormente se colocaron en el microhomogenizador TissueLyser, a 50Hz por 3 min. A cada tubo con micelio pulverizado se le adicionaron 500 µL de Buffer de Lisis (50mM Tris, pH 7.2, 50mM EDTA, 3 % SDS, 1 % mercaptoetanol) y se calentaron por 15 min a 65 °C. Posteriormente a cada muestra se le adicionaron 100 µL de acetato de potasio 8 M, se invirtieron 8 veces y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min. Se separó el sobrenadante de cada muestra y se le adicionaron 300 µL de isopropanol frío. Luego se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y el pellet resultante se lavó con 1 mL de etanol, primero al 75 % y al 95 %. Finalmente, se resuspendió la pastilla resultante en agua y se cuantificó con el espectrofotómetro de microvolumen Nanodrop TM 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Obtención de vectores

Para la obtención de vectores empleados en este trabajo (**Tabla 2**) se utilizó el Kit de Clonación In-Fusion®HD Cloning Kit de Clontech (Cat#639649, Lot#1509499A), utilizando el protocolo indicado por el fabricante. A continuación se detalla el procedimiento empleado.

Tabla 2: Vectores empleados en este trabajo.

Vector	Descripción	Referencia
pMT-mRFP1	Contiene al gen <i>argB</i> como marcador de selección, el promotor inducible <i>alcA</i> para el control de la expresión y la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente. Confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i>	Toews <i>et al.</i> (2004)
pEM03 (<i>cpsA</i>)	Derivado del plásmido pMT-mRFP1. Contiene la construcción <i>alcA(p)::cpsA::mRFP</i>	Este trabajo
pEM05 (<i>cps-1Nc</i>)	Derivado del plásmido pMT-mRFP1. Contiene la construcción <i>alcA(p)::cps-1Nc::mRFP</i>	Este trabajo

1. Vector para sobreexpresar y etiquetar CpsA de *A. nidulans*

Para la clonación de *cpsA* se utilizó pMT-mRFP1 (fig. 8, A) como vector parental. Este plásmido tiene las siguientes características: confiere resistencia a ampicilina a *E. coli*, el gen clonado queda bajo el control transcripcional del promotor del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa y también queda etiquetado con la proteína fluorescente mRFP. Además, el plásmido contiene al gen *argB* como marcador de selección en el hongo, el cual complementa la auxotrofia a arginina de cepas con mutaciones nulas en *argB* (Toews *et al.*, 2004). El diseño de la construcción se muestra en la fig. 8, panel B.

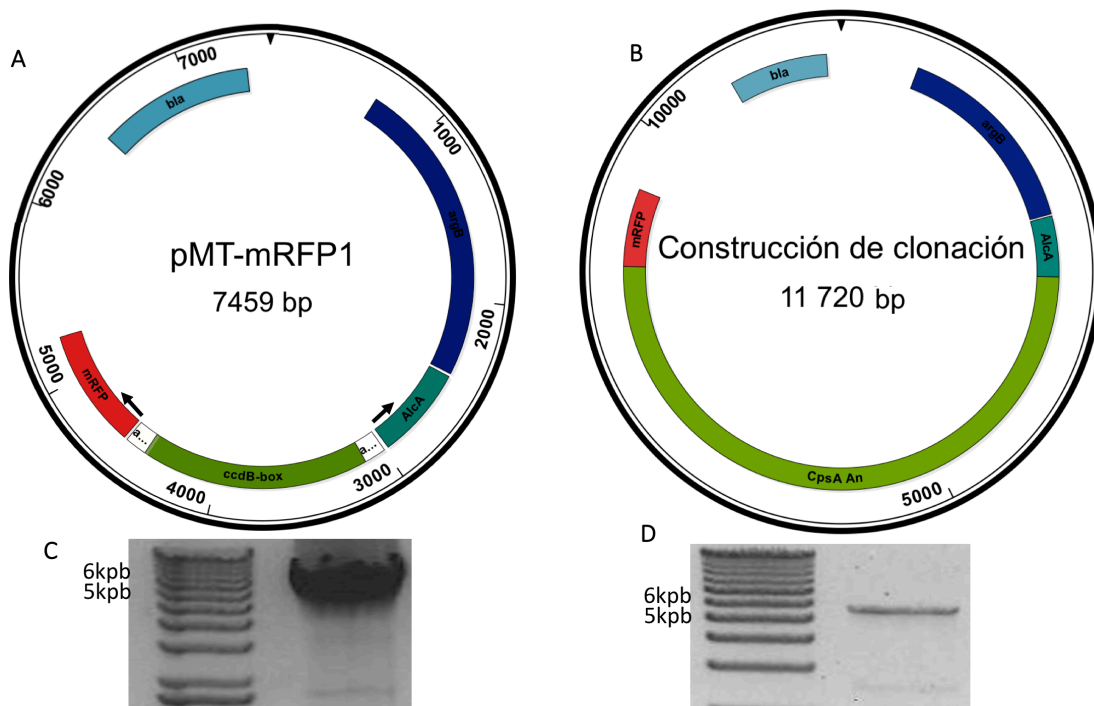


Figura 8. Mapa del plásmido parental, la construcción deseada y los productos amplificados para la clonación de *cpsA*. (a) Esquema del plásmido parental. Con flechas negras se esquematizan los oligonucleótidos divergentes empleados para realizar la clonación. En el esquema se muestra con azul claro el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*, en azul oscuro se muestra *argB*, que complementa la auxotrofia a arginina en *A. nidulans*. Río arriba del gen a clonar está el promotor del gen *alcA* (alcohol deshidrogenasa) (turquesa en el esquema) y río abajo, la etiqueta roja fluorescente mRFP. (B) Construcción esperada, en la que se mantiene *bla*, el promotor de la alcohol deshidrogenasa y la secuencia de mRFP. (c) Producto de amplificación del vector parental con oligonucleótidos que se representan en (a) como flechas divergentes, dando un tamaño de 5858 pb. (d) Producto de amplificación del gen *cpsA* de *A. nidulans* a partir de DNA genómico de la cepa CLK43, con un tamaño de 5862 pb. Estos dos últimos productos se utilizaron para realizar la clonación usando el Kit Infusion® HD de Clontech.

Para realizar la clonación se utilizó el Kit Infusion® HD de Clontech, que permite la inserción de un fragmento deseado de DNA en cualquier vector. Este fusiona dos fragmentos de DNA que tengan 15 pb de homología. La metodología consistió en lo siguiente:

- 1) Se linearizó el plásmido pMT-mRFP (**fig. 8 panel A**) por medio de PCR con oligonucleótidos divergentes a partir del sitio deseado de inserción (**mostrado en la figura con flechas**), utilizando el par de oligonucleótidos ICR1 e ICR2, dando como resultado el vector linearizado con un tamaño de 5858 pb (**fig. 8, panel C**).
- 2) Se amplificó el gen *cpsA* a partir de DNA genómico de *A. nidulans* por PCR con los oligonucleótidos híbridos (llamados ICR3 e ICR4) que contienen 15pb de homología con el plásmido linearizado, dando un producto de 5862 pb (**fig. 8, panel D**).
- 3) Se realizó la reacción de fusión usando la mezcla de enzima y el protocolo del fabricante.
- 4) Se transformaron las bacterias competentes, que en este caso fueron la cepa DH5-Alfa, y se inocularon en medio selectivo con ampicilina (100 µg/mL).

Se seleccionaron 12 colonias que crecieron en el medio selectivo, se inocularon en medio líquido y posteriormente se hicieron minipreps de éstas. Posteriormente se digirieron 4 con la enzima de restricción XbaI, dando el patrón de bandas esperado (9498 pb y 2232 pb, **fig. 9**, gel de la izquierda). También se digirieron con la enzima de restricción BglII, dando igualmente el patrón de bandas esperado (6183 pb, 4847 pb y 690 pb, **fig. 9** gel de la derecha), con lo que se comprobó que se obtuvieron los plásmidos esperados. A los plásmidos obtenidos se les nombró pEM01–pEM04.

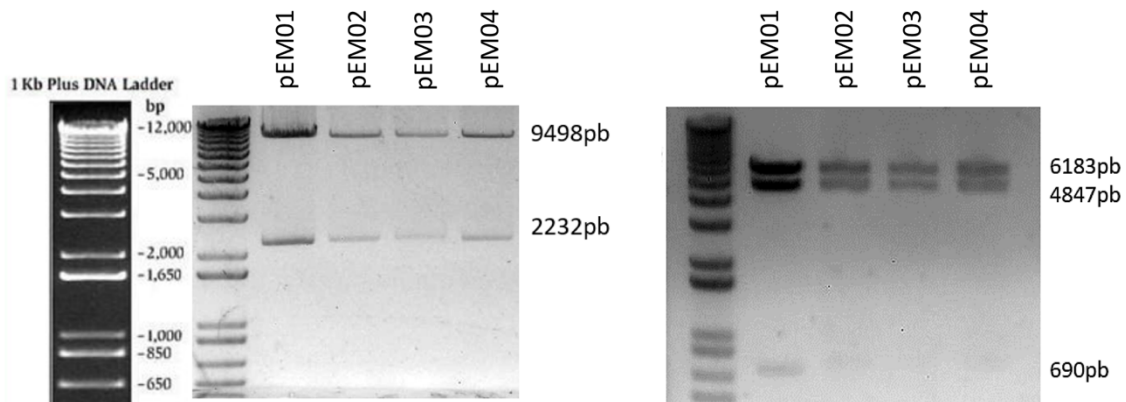


Figura 9. Comprobación de los plásmidos pEM01–pEM04. Izquierda: Digestión de pEM01–pEM04 con la enzima de restricción XbaI, dando los tamaños de banda mostrados en la figura. Derecha: digestión con la enzima BglII, con los tamaños de banda indicados a la derecha del gel.

Con el propósito de verificar que no hubiera mutaciones en la secuencia del gen clonado, ya que es de un tamaño relativamente grande y el correcto empalme entre las secuencias de *cpsA*, *alcA(p)* y mRFP, se solicitaron un total de 13 reacciones de secuenciación de DNA del plásmido pEM03, elegido arbitrariamente, a la Unidad de Biología Molecular del IFC, utilizando oligonucleótidos que ya se habían diseñado previamente en el laboratorio durante el trabajo con *cpsA*. En el **Anexo 4** se muestra la cobertura de cada una de las reacciones de secuenciación. Los resultados muestran que la secuencia del gen en el plásmido no contiene mutaciones y los sitios de empalme son tal como se diseñaron.

2. Vector para sobreexpresar y etiquetar *cps-1* de *N. crassa*

Con el objetivo de evaluar si el gen *cps-1* de *N. crassa* es capaz de complementar funcionalmente la ausencia del gen *cpsA* de *A. nidulans*, se diseñó un plásmido usando el vector parental pEM03 (mismo que se utilizó en este trabajo para sobreexpresar *cpsA* de *A. nidulans*), usando la metodología Infusion® HD de Clontech ya descrita.

En la **fig. 10**, se muestran los productos que se utilizaron para la obtención del plásmido mencionado. El **panel A** esquematiza el vector parental y el inserto que se obtuvo a partir del DNA genómico de una cepa silvestre de *N. crassa* y se señalan con flechas los oligonucleótidos empleados para amplificarlo. Los productos de amplificación por PCR se muestran en los paneles **B** y **C**. Para la obtención del inserto (gen *cps-1* de *N. crassa*) se realizó un gradiente en la temperatura de alineamiento del PCR (**panel C**), ya que con la temperatura calculada por servidores digitales no se obtuvo el producto.

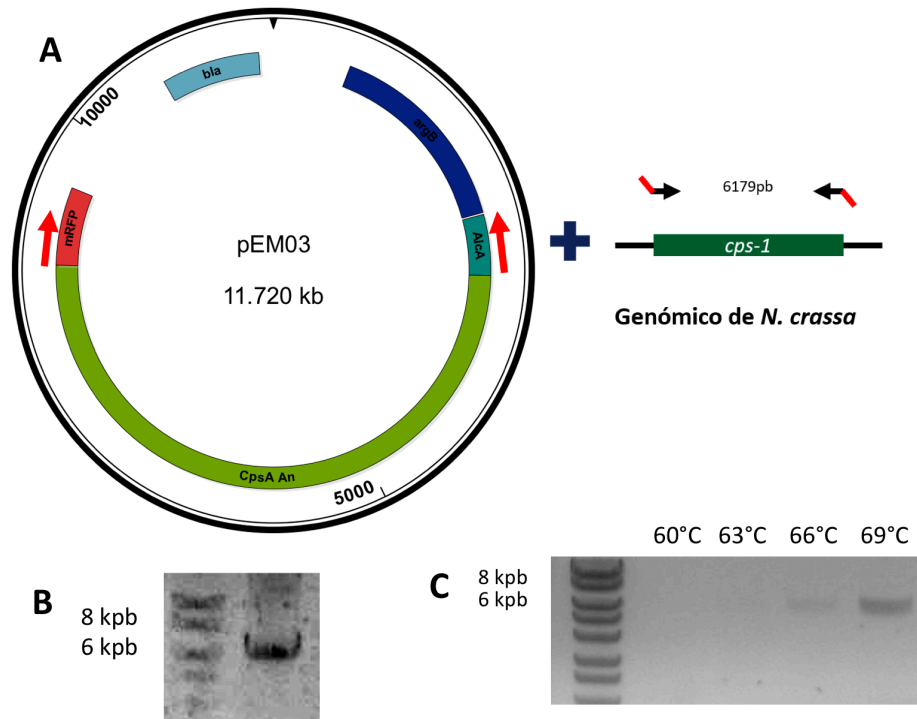


Figura 10. Esquema de plásmido parental pEM03 y amplificación del gen *cps-1* de *N. crassa*. (A) Esquema del plásmido parental y de los primers utilizados para amplificar el gen *cps-1*. Con flechas rojas se esquematizan los oligonucleótidos divergentes empleados para realizar la linearización del plásmido parental y con flechas negras se muestran los que se usaron para obtener el producto de *cps-1* de *N. crassa*. (B) Producto de la linearización del vector parental, con un tamaño de 5858 pb. (C) Producto de amplificación del gen *cps-1* de *N. crassa* a partir de DNA genómico de una cepa silvestre, con un tamaño de 5862 pb. Estos dos últimos productos se utilizaron para realizar la clonación usando Infusion® HD.

Tras la reacción de ensamblado con el Kit Infusion® HD de Clontech, se transformó la cepa XL-Blue de *E. coli* y se seleccionaron 10 colonias que crecieron en medio selectivo las cuales se utilizaron para hacer minipreps de DNA. De estas se seleccionaron 5 y se digirieron con la enzima de restricción BglII, dando el patrón de bandas esperado (5800 pb, 4100 pb y 1700 pb, **fig. 11**, gel de la derecha). Como control se digirió el plásmido parental (pEM03), que da un patrón de digestión de 6183 pb, 4847 pb y 690 pb. Con esto se comprobó la obtención de los plásmidos esperados, los cuales se nombraron pEM05–pEM08.

Al igual que con el plásmido que contiene el gen de *A. nidulans*, el tamaño del inserto (*cps-1* de *N. crassa*) es grande. Con el propósito de verificar que no hubiera mutaciones en la secuencia del gen clonado se solicitaron un total de 10 secuenciaciones a la Unidad de Biología Molecular del IFC del plásmido pEM05, mostrado en el carril 1 de la **fig. 11, gel de la derecha**. En el **Anexo 5** se muestra la cobertura de cada una de las reacciones de secuenciación, así como los alineamientos entre la secuencia de los sitios de empalme entre la secuencia de *cps-1* con *alcA(p)* y de *cps-1* con *mRFP*.

Los resultados muestran que la secuencia del gen en el plásmido no contiene mutaciones y que los sitios de empalme son como se diseñaron.

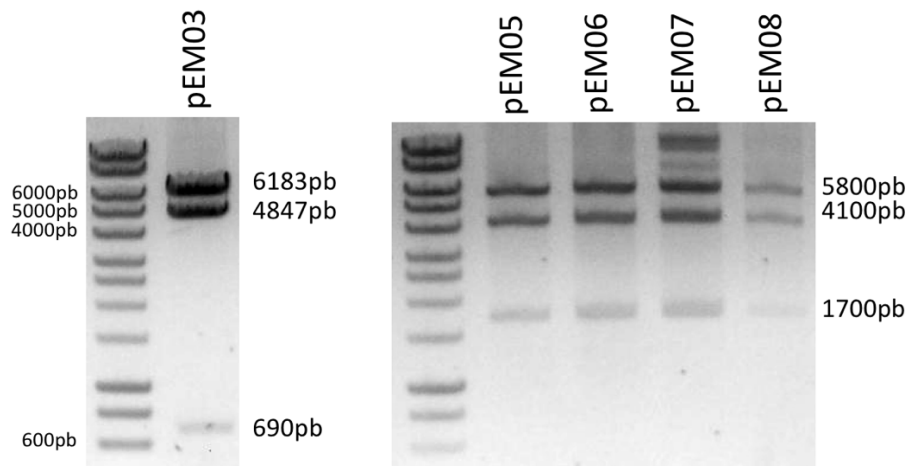


Figura 11. Comprobación de los plásmidos pEM05-pEM08. Izquierda: Digestión del vector parental con la enzima BgIII, dando los tamaños de banda mostrados en la figura. **Derecha:** digestión de minipreps con la enzima BgIII, con los tamaños de banda esperados a la derecha del gel. Los plásmidos obtenidos se nombraron pEM05–pEM08.

Las cepas utilizadas para la transformación bacteriana de *E coli* fueron DH5 α y XL-1 Blue y las células competentes fueron preparadas en el laboratorio siguiendo el siguiente procedimiento: se tomaron 2 mL de un cultivo dejado toda la noche y se agregaron a 200 mL de medio LB. Se incubaron a 37 °C con agitación a 300 rpm y se cultivaron hasta una densidad óptica de 0.3 a 0.6 a 550nm de longitud de onda. Posteriormente se centrifugaron a 4600 rpm y 4 °C por 10 min en tubos Falcon de 50 mL. Luego se resuspendieron las células en 2 mL de medio 2xYT-CC* frío, se alicuotaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

*El 2xYT-CC se preparó añadiendo a 60 mL de medio 2xYT (1.6 % peptona, 1 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl) 0.7g de NaCl, 10g de PEG (3350, 4000 u 8000), 10 mL de glicerol al 100 %, 1 mL de solución de MgCl₂ 1M, 1 mL de solución de MgSO₄ y 5 mL de DMSO, después de lo cual se ajustó el volumen a 100 mL con agua y luego el pH a 6.5-7.0. Esta solución se esterilizó por filtrado y se almacenó a -20 °C.

Para la transformación bacteriana se mezclaron 2 μ L del DNA plásmidico o de la reacción de In-Fusion con 50 μ L de KCM** frío y luego se añadieron 50 μ L de células competentes. Se dejó incubar en hielo por media hora después de lo cual se realizó un choque térmico a 42 °C por 2 min. Tras esto se pusieron las células a recuperar con incubación a 37 °C y agitación a 300 rpm, después de lo cual se plaquearon en LB con ampicilina. Al día siguiente en la mañana se verificó la presencia de colonias transformantes.

**El KCM es KCl 100 mM, CaCl₂ 30mM y MgCl₂ 50 mM, se esterilizó por filtrado y se guardó en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

Transformación por electroporación y por fusión de protoplastos

Para la obtención de células electrocompetentes se utilizó el protocolo de Sánchez y Aguirre (1996), que básicamente consistió en lo siguiente: se extrajeron esporas de un cultivo de 5 días sobre medio sólido de las cepas correspondientes, mismas que se suspendieron en agua, se filtraron usando tela miracloth y se lavaron 3 veces con 10 mL de agua destilada. Éstas se utilizaron para inocular 100 mL medio mínimo de Kaffer suplementado y colocado en un matraz a una densidad de 3×10^7 esporas/mL, con incubación a 37 °C en un agitador rotatorio ajustado a 300 rpm. Después de 2 h se recuperaron los conidios por centrifugación y se lavaron con agua destilada, después de lo cual se volvieron a concentrar, se desechó la mayor cantidad posible de agua y se resuspendieron en 15 mL de buffer de pretratamiento (extracto de levadura 1 %, glucosa 1 %, HEPES 20 mL con pH ajustado a 8.0 con Tris 100mM). Después se incubaron a 30 °C por una hora en un agitador rotatorio ajustado a 100 rpm. Luego la muestra se centrifugó, se desechó el sobrenadante y se resuspendió por completo y cuidadosamente en 1 mL de Amortiguador de Electroporación (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 270mM sacarosa, 1 mM de acetato de litio). El total de este volumen se distribuyó en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Para la electroporación, se añadió aproximadamente 1 µg de DNA purificado a un volumen de 50 µL de las células electrocompetentes previamente obtenidas, se incubó en hielo por 15 min y se transfirió a una celda de electroporación de 0.2cm. La electroporación se realizó utilizando el instrumento Bio-Rad Gene Pulser y el Pulse Controller Apparatus, con un voltaje de 1,000 V, capacitancia de 25 µF y resistencia de 400 Ohmios.

Después de la electroporación, se añadió 1 mL de YEG (extracto de levadura 1 %, glucosa 1 %) a la suspensión de esporas electrocompetentes contenida en la celda de electroporación, se transfirió la misma a un tubo Eppendorf y se incubó por 60 a 90 min con una temperatura de 30 °C y con agitación. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 300 µL de la suspensión en medio con todos los suplementos menos aquel para el que se busca obtener la auxotrofia con la transformación, se incubaron a 37 °C y a los 2-3 días se seleccionaron las colonias observadas.

Para aquellos casos en los que la transformación por electroporación de células electrocompetentes no diera transformantes, se utilizó la transformación por fusión de protoplastos siguiendo el protocolo de Yelton *et al.* (1984) con algunas modificaciones, consistiendo en lo siguiente: Matraces de 1 litro con 400 mL de medio mínimo líquido adecuadamente suplementado se inocularon con 8×10^8 conidios de la cepa por transformar y se incubaron con agitación a 150 rpm y 30 °C por 12 h, hasta que se pudieran observar al microscopio óptico pequeños agregados de germínula jóvenes. Tras esto, se colectaron estas germínulas por

filtración, se lavaron con 0.6 M de $MgSO_4$, se resuspendieron en medio osmótico (1.2 M $MgSO_4$ /10 mM fosfato de sodio, pH 5.8; 5 mL/g de micelio) esterilizado por filtración y se transfirieron a un matraz de 250 mL mismo que se colocó en hielo. A esta suspensión se le agregaron 500 μ L de una solución de enzimas líticas (Lytic Enzymes from *Trichoderma harzanium*, Sigma, 25 mg/ 500 μ L) y se incubó a 80 rpm por 90 min a 30 °C. La suspensión se transfirió posteriormente a un tubo de centrífuga, se le agregaron 10 mL de buffer ST (0.6 M sorbitol/100 mM Tris-HCl, pH 7.0) y se centrifugó en un rotor de columpio a 5500 rpm y 4 °C por 15 minutos. Se colectaron los protoplastos en la interface de la solución usando una pipeta Pasteur y se colocaron en hielo. Se removió el buffer ST remanente, se resuspendió la pastilla formada al fondo del tubo, se agregó buffer ST nuevo, y de nuevo se centrifugó para recuperar más protoplastos. Luego se recuperaron los protoplastos por centrifugación, se diluyeron con 2 volúmenes de buffer STC (sorbitol 1.2 M/10 mM Tris-HCl, pH 7.5/10 mM $CaCl_2$), se lavaron dos veces por centrifugación con 10 mL de buffer STC y se resuspendieron en el mismo buffer. Para la transformación, se mezcló 1 μ g de DNA y se diluyó en STC en un tubo de centrífuga de 15 mL, después de lo cual se añadieron 100 μ L de solución de protoplastos y se incubó por 25 min a temperatura ambiente. Tras esto se incubó a 42 °C por 2 min y se colocó en hielo por 4 minutos. A esta suspensión se le añadieron 350 μ L de solución de PEG (60 % polietilenglicol 3350/10 mM Tris-HCl, pH 7.5/ 10 mM $CaCl_2$, y luego se añadieron otros 350 μ L, y se finalmente 850 μ L, con agitación manual tras cada una de las adiciones de esta solución. Después de incubar por 5 min a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de STC y se distribuyó la mezcla en 3 cajas con medio mínimo adecuadamente suplementado (con los suplementos que necesita la cepa menos aquel para el cual se está seleccionando) y con 1.2 M de sorbitol. Tras 5 días de incubación a 37 °C se asilaron las transformantes obtenidas.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de las esporas y de los cultivos conidiantes se recolectaron fragmentos de la muestra correspondiente a los tiempos que indica cada experimento, se filtraron pasando por un embudo con miracloth, se lavaron, se secaron con toallas de papel y se transfirieron a un tubo de 2 mL que contenía un balón de metal de 5mm y que había sido enfriado en nitrógeno líquido. Posteriormente se congelaron las muestras y se trituraron usando los mismos parámetros que se utilizan para la extracción de DNA. Una vez triturado el micelio, se procedió con la extracción de RNA usando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, No. Cat. 7404). La concentración de ácidos nucleicos se determinó con un Nanodrop TM 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Las muestras se trataron con DNasa usando 1 U de la Dnasa RQ1 (Promega, Madison, W1, No. Cat M6101) por μ g de RNA. Un total de 1 μ g del RNA obtenido se utilizó para generar cDNA con la transcriptasa reversa VILO Superscript III (Invitrogen, No. Cat. 11754-050).

Diseño de oligonucleótidos y condiciones de RT PCR

Se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos para amplificar los transcritos del gen *an0842* (*cpsA*), mientras que se utilizó un set previamente diseñado en el laboratorio para los genes de referencia (Pérez, 2017) y uno reportado en la literatura para *brlA* (Ruger-Herreros *et al.*, 2011).

Los experimentos de qPCR se realizaron en el termociclador de tiempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Para detectar el producto de amplificación se empleó el fluoróforo SYBR Green. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL con 5 µL de Platinum R SYBR R Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, No. Cat. 11744-500, Lot. 1565691) 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos forward y reverse de cada gen con una concentración de 5 pmol/µL, 2 µL de cDNA a una concentración de 100 ng/µL y agua. En los controles negativos se añadieron 2 µL de agua en lugar de cDNA.

Para calcular la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados se realizaron diluciones seriales 1:10 partiendo de una concentración de 1 µg. Los resultados obtenidos se analizaron en el StepOne Software. Mediante análisis de regresión lineal esperando una R^2 de 0.99. El programa de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 40 segundos a 60 °C, seguida de 15 segundos a 95 °C y finalmente una curva de desnaturalización con incrementos de 0.3 °C cada 6 segundos en un gradiente lineal de 60-95 °C. Las reacciones se realizaron por triplicado en tubos MicroAmpR Fast reaction (Applied Biosystems, No. Cat. 4358293). Los niveles de expresión se obtuvieron haciendo uso del StepOne Software.

Microscopía

Para las observaciones realizadas por microscopía de epifluorescencia se usó un microscopio Nikon Eclipse E600 y una cámara Neo Andor Scmos con sistema de enfriamiento. Las imágenes obtenidas se procesaron empleando el programa ImageJ. Para las observaciones realizadas por microscopía confocal se utilizó el equipo Zeiss LSM 800 y para la edición de las mismas se utilizó el programa ZEISS ZEN.

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5 → 3`
ICR1	ATGGCCTCCTCCGAGGAC
ICR2	CTGTTGATTGTTGGTTGATGATGT
ICR3	ACCAACAATCAACAGATGGCGGAGGAACATCCCG
ICR4	CTCGGAGGAGGCCATCAGGAAGTCCCTGCGGGC
TCFor	ACCAACAATCAACAGATGGCCGCGGTTAACCCC
TCRev	CTCGGAGGAGGCCATCTTCCCATCTCCTCCACCCAAAGC
AlcAFor	CGGAAATTGACACACCACTC
PR8	ATTGTCAAAGTTCGACATTGGCG
CpsA1For	GCGAAGCACTCTGGGTCTTG
CpsA1Rev	GGCAAAATCAACAGGCGAAA
CpsA2For	TCGTACTTGGAGGCATTGGAGA
CpsA2Rev	CCGCCAGCTTGGAAAACAG
BrlAFor	TACCGCGACGGGTTTCAG
BrlARev	GAGGTCTGTCGTCGGAGCAT
ActAFor	TATGTGCAAGGCCGGTTT
ActARev	AGGATACCACGCTTGGACTG
TubAFor	CAATTCCTGCTGGGAGCTT
TubARev	CATAGATGGTGCGTGGAACA
GpdAFor	TTTTCCGTAACGCCATCG
GpdARev	AATGGTCCCTTGAAGTAC
TC9	ATCCCATATTCTGCCCTACTCGGTGGTATTT
TC10	GGCCCCAATGACATAGAAAGGAGCGATGG
5Dig-nkuA	GATGCTGTCCTTTTTGCC
3Dig-nkuA	GCTGAAGAGTGCGAGACG

RESULTADOS

1. El RNAm de *cpsA* se acumula durante el desarrollo de estructuras de reproducción asexual

Para determinar en qué momentos del desarrollo de *A. nidulans* se expresa el gen *cpsA* se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para amplificar el transcrito de este gen y detectarlo por RT-PCR. Por medio de PCR de punto final utilizando cDNA de las muestras blanco se probó la pureza del cDNA obtenido, así como la especificidad de ambos pares de oligonucleótidos, para lo cual también se realizaron curvas de disociación (**Anexo 1**).

Para evaluar la expresión de un gen por qPCR es necesario evaluar la expresión constitutiva de diferentes genes que podrían servir como controles endógenos, ya que no siempre la expresión de los mismos es constante en las condiciones experimentales utilizadas (Kozera y Rapacz, 2013). Usando oligonucleótidos para RT-PCR previamente diseñados en el laboratorio, se evaluó la expresión de los genes *gpdA* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *actA* (gamma actina) y *tubA* (alfa tubulina) como controles endógenos. En el **Anexo 2** se muestran los algoritmos utilizados para evaluar la estabilidad de los genes probados. El gen *gpdA* es el que mostró menor variabilidad en las condiciones experimentales y por lo tanto es el que se utilizó como gen de referencia.

Durante estas pruebas se observó que gen *cpsA* muestra una expresión muy baja, como se puede ver al comparar sus valores de cT promedio con los de los genes endógenos de referencia. El cT promedio es un valor que indica el umbral a partir del cual se empieza a detectar un incremento exponencial en la fluorescencia emitida por el SYBR Green y por lo tanto es el parámetro que se utiliza para determinar la abundancia relativa de transcritos. Cada unidad de diferencia (n) entre dos valores de cT indica una diferencia en la abundancia de transcritos de 2^n , con lo que se deduce que, en el resultado mostrado, hay un transcrito de *cpsA* por cada 1105 transcritos de *actA* y por cada 1448 transcritos de *gpdA* (**fig. 12**).

Transcrito	cT Prom
<i>actA</i>	21.16
<i>gpdA</i>	20.77
<i>tubA</i>	24.93
<i>cpsA</i>	31.27

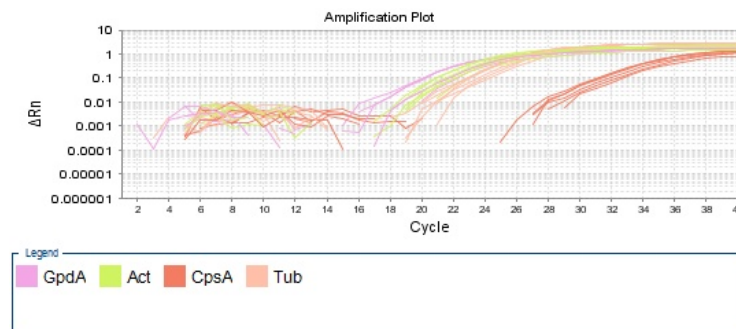


Figura 12. El gen *cpsA* tiene un nivel de expresión muy bajo en comparación con los genes de referencia. **Tabla de la izquierda:** cT calculado por el software StepOne™ de los genes de referencia probados (*actA*, *gpdA*, *tubA*) y del gen *cpsA*. **Gráfica de la derecha:** gráfica de amplificación que muestra la diferencia de fluorescencia detectada contra el ciclo de amplificación. Como se puede observar, desde el ciclo 15 y hasta el 22 se detectó la fluorescencia emitida por la detección de los genes endógenos de referencia, mientras que *cpsA* se detectó en los ciclos 27 al 30.

Para evaluar la expresión del gen *cpsA* durante el desarrollo, se amplificó su transcrito a partir de cDNA sintetizado a partir del RNA total extraído de la cepa silvestre (11035) en diferentes etapas del desarrollo, correspondientes a conidios, 2, 4 y 6 h de inducción de la germinación; micelio (18 h de crecimiento en medio líquido con agitación) y tras la inducción de la conidiación. Como muestra la **fig. 13**, *cpsA* mostró niveles elevados de expresión en conidios y durante la conidiación, mientras que durante la germinación y en micelio vegetativo la expresión de este gen fue mínima.

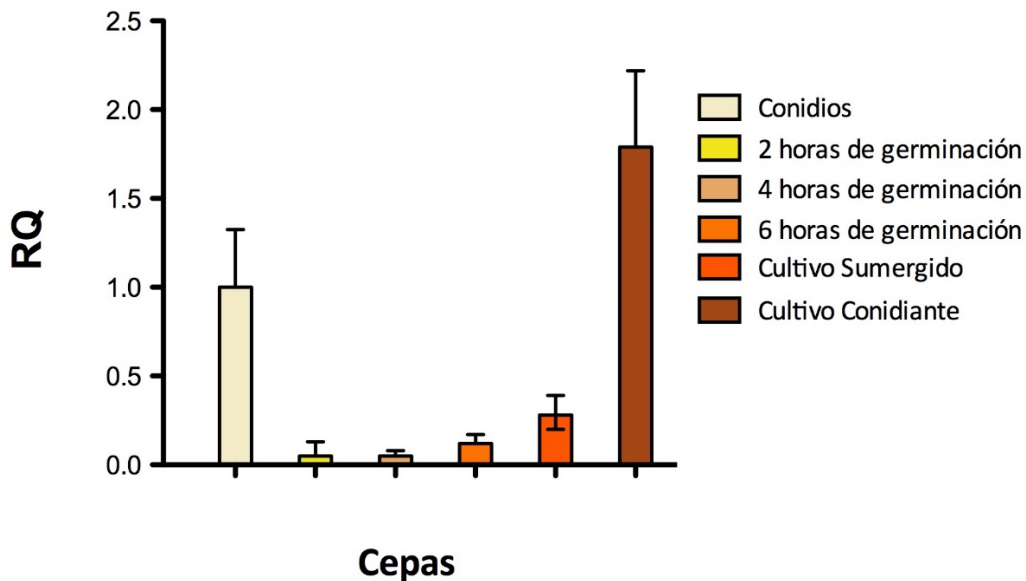


Figura 13. Patrón de expresión del gen *cpsA*. *cpsA* se amplificó a partir de RNA obtenido de la cepa WT (11035) en diferentes etapas del desarrollo, incluyendo conidios, durante la germinación (a 2, 4 y 6h tras haberla inducido) en hifas vegetativas antes de inducir la conidiación (Cultivo sumergido) y durante la conidiación (Cultivo conidiante). La acumulación del transcrito fue graficada en unidades de cantidad relativa (RQ) en comparación con el nivel de transcrito en las esporas. Los datos se normalizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando *gpdA* como la referencia interna. Las barras de error muestran el error estándar.

2. La eliminación de *cpsA* abate la expresión de *brlA*

Como se mencionó en la introducción, la eliminación de *cpsA* provoca una disminución severa en la conidiación de *A. nidulans*. En este hongo, el gen *brlA* es el regulador principal del desarrollo asexual. El transcrito de *brlA* no está presente en las hifas ni en los conidios maduros, mientras

que se comienza a acumular rápidamente después de la inducción de la conidiación (Aguirre, 1993).

Se compararon los niveles de expresión de *brlA*, tras la inducción de la conidiación, en una cepa $\Delta cpsA$ y una silvestre (CLK43). Para esto se usaron oligonucleótidos con secuencia ya publicada (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). La especificidad de los de oligonucleótidos se comprobó por PCR de punto final y por curvas de disociación (**Anexo 3**), de la misma forma que se hizo con los oligonucleótidos para *cpsA*. Como gen endógeno de referencia se utilizó *gpdA*. La obtención del cDNA de las muestras y los experimentos de RT-PCR se realizaron de forma similar a las ya mencionadas.

Para la evaluación de los niveles de expresión de *brlA* se realizaron cultivos de conidiación simultánea, que básicamente consisten en crecer el organismo en medio líquido con agitación por 18 h, seguido de su exposición al aire (Aguirre, 1993). Como se muestra en la **fig. 14**, la expresión de *brlA* se encuentra severamente disminuida en una cepa sin el gen *cpsA*.

Niveles relativos de expresión de *brlA* antes y después de inducir la conidiación

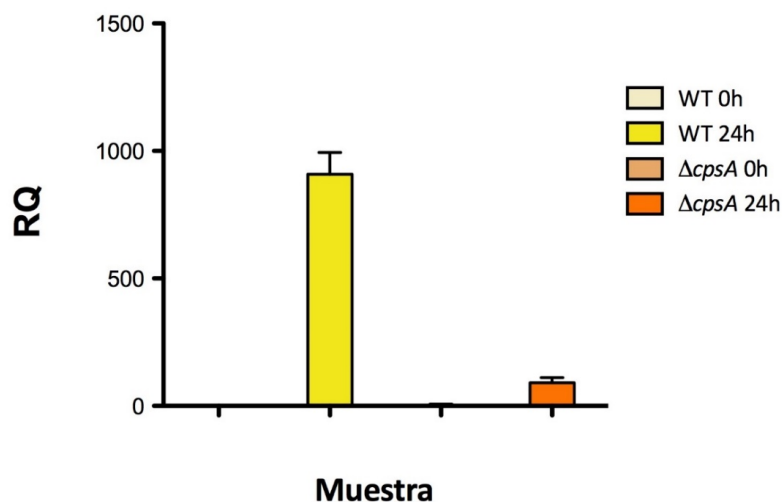


Figura 14. El gen *cpsA* se requiere para la expresión del gen *brlA*, durante la conidiación. El gen *brlA* fue amplificado de cDNA obtenido de hifas vegetativas maduras creciendo en medio líquido (0h) y de cultivos de conidiación simultánea (24h) de las cepas silvestre (WT) y mutante ($\Delta cpsA$). La acumulación de transcritos fue graficada en relación con el nivel a las 0h de la cepa silvestre. Los datos se normalizaron con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando *gpdA* como el control interno. Las barras de error representan el error estándar.

El gen *brlA* es inducido en las etapas tempranas de la conidiación, de forma simultánea a la formación de las vesículas (Yu, J.-H., 2011). Con el fin de evaluar la capacidad de la cepa $\Delta cpsA$ para formar conidióforos, se observaron con microscopía óptica cortes laterales de colonias de la

cepa. Para esto, se inocularon esporas al centro de una caja Petri con medio sólido adecuadamente suplementado y se dejó crecer el micelio por 5 días a 37 °C, después de lo cual se realizaron las observaciones. Como se puede ver en la **fig. 15**, la mutante en comparación con una cepa silvestre no puede producir tallos normales de conidióforos (indicados con flechas amarillas en la imagen de la izquierda) y en su lugar produce tallos una morfología anormal, en la que no pueden mantener la posición erguida que los caracteriza (indicado en la figura con flechas naranjas), y presentan un grosor irregular.

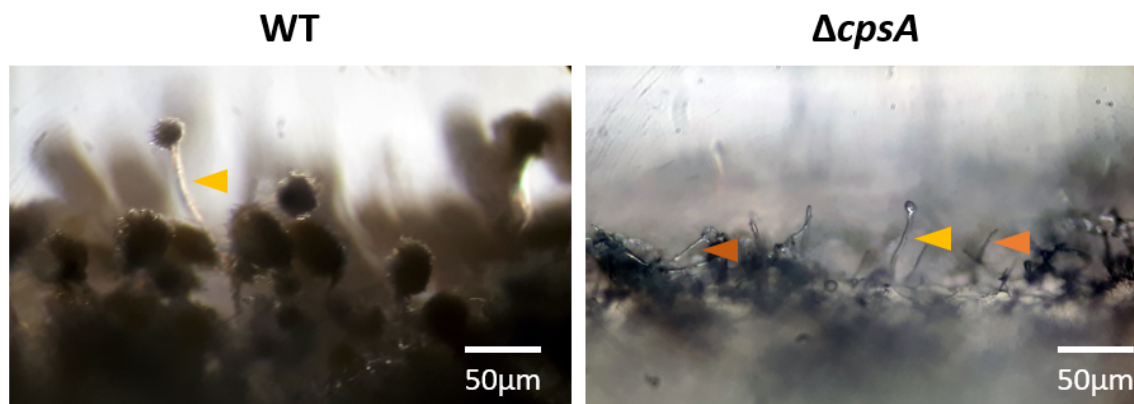


Figura 15. La cepa $\Delta cpsA$ forma pocos tallos de conidióforos y con morfología aberrante. En las fotografías se observan cortes laterales de colonias tras 5 días de crecimiento, observadas con microscopía óptica a una distancia de 1cm del borde de la colonia. Los tallos de conidióforos se señalan con flechas amarillas y con flechas naranjas se muestran algunos que se inclinan hacia el medio de cultivo.

3. Comprobación de la funcionalidad de la construcción *alcA::cpsA::mRFP*

Con el objetivo de determinar la sublocalización celular de la proteína CpsA, se diseñó una construcción para etiquetarla con la proteína verde fluorescente (GFP) *in locus*. Sin embargo, tras la obtención de las cepas no se detectó ninguna fluorescencia (no se muestra), posiblemente debido a la baja expresión del gen. Debido a esto diseñó una construcción en un vector que permitiera sobreexpresar la proteína etiquetada, como se muestra en materiales y métodos.

La cepa RMS011 (auxótrofa a ácido para-aminobenzóico y arginina) se transformó inicialmente por electroporación con el plásmido pEM03 (materiales y métodos, **fig. 9**) y tras no obtener transformantes, se realizó el protocolo de transformación por fusión de protoplastos. Se obtuvieron tres transformantes mismas que se purificaron 3 veces por colonia aislada, como se observa en la **fig. 16**.

Se extrajo DNA genómico de las 3 transformantes que se utilizó para realizar PCR diagnósticas de la inserción de la construcción deseada, usando un par de oligonucleótidos dirigidos contra las

secuencias de *alcA(p)* y *cpsA*. Como se muestra en la **fig. 16, panel C**, dichos oligonucleótidos amplificarían un fragmento de 1292 pb si la construcción está presente. Como se ve en la **fig. 16**, las tres transformantes analizadas tuvieron integrada la construcción *alcA::cpsA::mRFP* (carriles 3-5) presente en el plásmido que se utilizó para transformarlas. Como control positivo de la reacción se utilizó el plásmido pEM03 (carril 2).

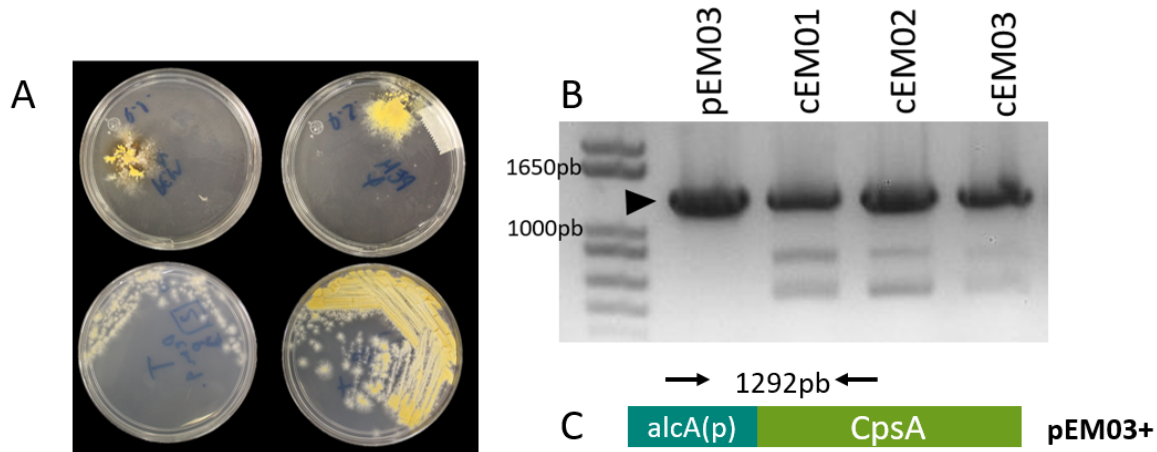


Figura 16. Comprobación de transformantes de *A. nidulans* obtenidas con el plásmido pEM03 (construcción *alcA::cpsA::mRFP*). A) Se muestran pases para colonia aislada de tres transformantes Arg⁺ en medio selectivo con Sorbitol 1.2M. B) Productos de PCR utilizando como moldes el plásmido pEM03 (carril 1) o DNA genómico de las tres cepas Arg⁺ obtenidas (cEM01-cEM03, carriles 2 a 4). Se usó un par de oligonucleótidos que amplifican 1292pb que hibridan con la secuencia del promotor *alcA* y el gen *cpsA* (**panel C**). Como se ve en el gel del **panel B**, las tres transformantes poseen la construcción *alcA::cpsA*, también presente en el plásmido pEM03.

Con el objetivo de determinar si la presencia de la construcción afectaba el fenotipo de las cepas, se realizó una prueba general de fenotipo de esporulación y crecimiento de las cepas, misma que se muestra en la **fig. 17**. Como se puede observar, la presencia de la construcción no afecta el fenotipo de las cepas.

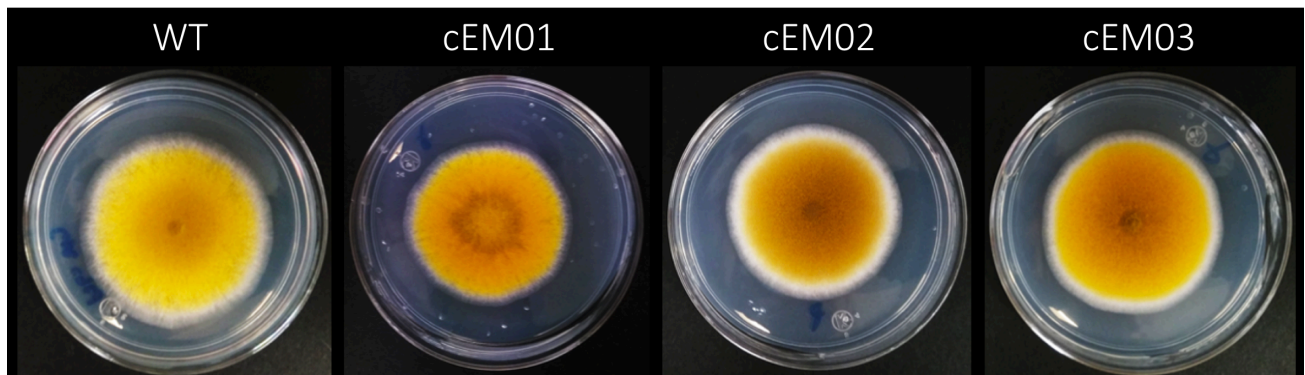


Figura 17: La construcción *alcA::cpsA::mRFP* no afecta el fenotipo de crecimiento y conidiación en un fondo silvestre. Se inocularon 1×10^4 esporas de las cepas indicadas en medio adecuadamente suplementado y con glucosa como fuente de carbono. Posteriormente se fotografiaron a los 5 días de crecimiento.

Para determinar si la construcción *alcA::cpsA::mRFP* puede reemplazar al gen *cpsA* nativo, se realizaron cruza entre la cepas cEM01-03 y la Δ an0842-4 (*pyrG89 pyrA4 riboB2 Δ nkuA::argB veA1 Δ an0842::AfriboB*), la cual carece del gen *cpsA*. Se obtuvieron cleistotecios híbridos (con ascosporas provenientes de la cruce de ambas cepas parentales) y la progenie se plaqueó en medio con los suplementos que necesitan las dos cepas parentales, de modo que se observara el patrón de segregación completo (**fig. 18**).

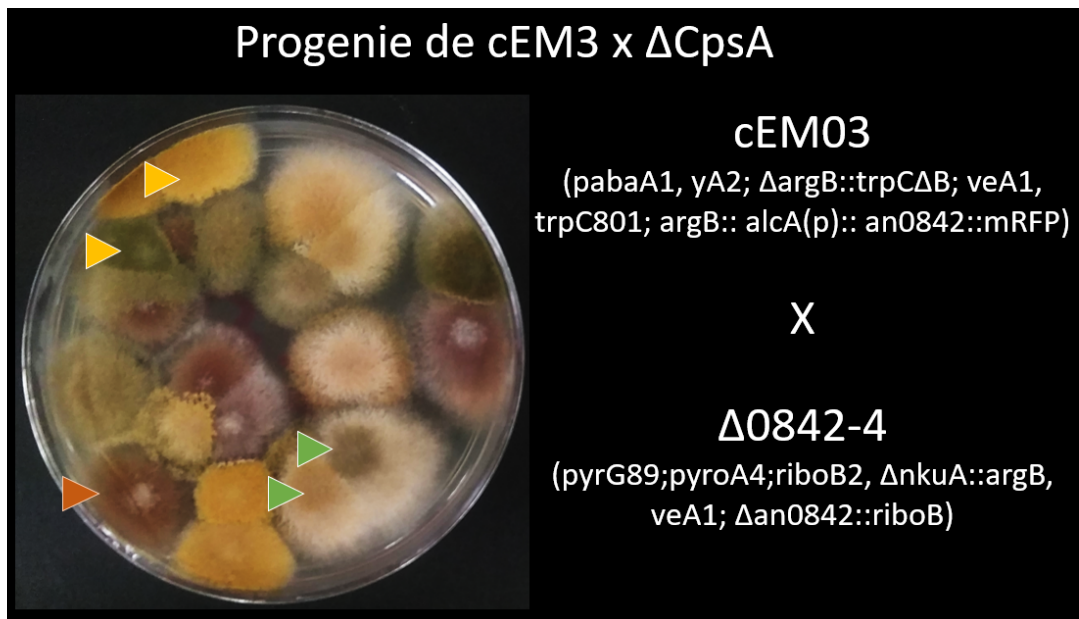


Figura 18. Patrón de segregación de la cruce de una cepa Δ *cpsA* con una cepa con la construcción *alcA::cpsA::mRFP*. Se plaquearon 40 μ L de una suspensión de ascosporas obtenidas de la cruce sexual entre la cepa cEM03 (*pabaA1, γ A2, Δ argB::trpC Δ B, veA1, trpC801 argB::alcA(p)::an0842::mRFP*) y la cepa Δ 0842-4 (*pyrG89, pyrA4, riboB2, Δ nkuA::argB, veA1 Δ an0842::AfriboB*), que es Δ *cpsA* en medio con glucosa como fuente de carbono. La progenie muestra diversos fenotipos: uno con conidiación claramente silvestre (indicado con **flechas amarillas**), otros con un fenotipo Δ *cpsA* (**flechas cafés**), mientras que otros muestran un fenotipo con esporulación en el centro de la colonia y que podría considerarse como un fenotipo intermedio (**flechas verdes**). Estos últimos descendientes muy probablemente corresponden a aquellos que no tienen el gen *cpsA* nativo, pero si contienen la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP*.

En la **fig. 18** se muestra una fotografía representativa del patrón de segregación de la cruce mencionada, en medio con glucosa como fuente de carbono. Para analizar este patrón de segregación hay que tener en cuenta que las cepas parentales cEM01-03 forman esporas amarillas, debido a la presencia del alelo γ A2 que confiere este fenotipo, mientras que la cepa

Δ an0842-4 formaría esporas verdes, lo cual corresponde con la presencia de un alelo silvestre *yA*. En la progenie se observaron colonias con fenotipo Δ *cpsA* (flecha naranja), con esporulación prácticamente nula y una coloración café en la colonia; otras con fenotipo silvestre (flecha amarilla), con buena esporulación y pigmentación de las esporas amarilla o verde y otras con un fenotipo intermedio (flechas verdes) tanto en fondo amarillo (*yA2*) como en fondo verde (*yA*). En éstas últimas, se observó de manera visual una esporulación entre la mutante y la silvestre y una mayor producción de micelio aéreo, que en la fotografía se observa como áreas blancas de crecimiento con poca pigmentación en la periferia de las colonias. Este patrón de segregación sugiere que los niveles bajos de expresión de la construcción *cpsA::mRFP* en medio con glucosa (represor del promotor *alcA*) fueron suficientes para complementar la carencia del gen *cpsA* nativo.

Con el propósito de obtener cepas isogénicas, se plaquearon ascosporas de las cruzas mencionadas en medio suplementado únicamente con ácido para-aminobenzóico, de modo que las cepas que crecieran tuviesen la auxotrofia por “paba” (dada por el alelo *pabaA1*), ya que es una auxotrofia que se usa ampliamente en el laboratorio y que es conveniente para la comparación con otras cepas que tengan el mismo fondo. De éstas, se seleccionaron 16 de aquellas que presentaran el fenotipo intermedio mencionado anteriormente y se crecieron en medio sin suplementos para descartar aquellas cepas sin la mutación *pabaA1*. Se eliminaron 4 cepas sin auxotrofia y del resto se seleccionaron otras 4, mismas que se nombraron cEM04-07.

A estas 4 cepas se les extrajo DNA genómico que se utilizó para realizar PCR diagnósticas para comprobar:

1. La presencia de la mutación Δ *cpsA*.
2. La presencia de la construcción *alcA::cpsA*.
3. La presencia o ausencia del gen *nkuA* silvestre ya que la cepa parental Δ an0842-4 contiene la mutación Δ *nkuA*, usada en el laboratorio para eliminar la recombinación no-homóloga del DNA usado para transformar.

En la **fig. 19** se esquematizan las estrategias empleadas para las reacciones diagnósticas. Para comprobar que las cepas tuvieran la construcción *alcA::cpsA* integrada se utilizaron un par de oligonucleótidos uno de los cuales es interno a la secuencia *alcA(p)* y el otro interno a la secuencia del gen *cpsA*, mismos que se utilizaron previamente para verificar la presencia de la construcción en las cepas cEM01-03 y que amplifican un fragmento de 1292pb si la construcción está presente (**fig. 19, A**). Para comprobar que las cepas fueran Δ *cpsA* se utilizaron un par de oligonucleótidos externos al gen, de modo que si el gen nativo está presente se amplifica una banda de 7313pb y si el mismo está remplazado por el cassette *RiboBAF* se amplifica una banda de 3391pb (**fig. 19, B**). Para la reacción para verificar la presencia de *nkuA* se utilizaron un par de oligonucleótidos que

amplifican la secuencia del gen, de modo que se obtiene un producto de 2078pb si el gen está presente y si no lo está no se obtiene ningún amplicón (fig. 19, C).

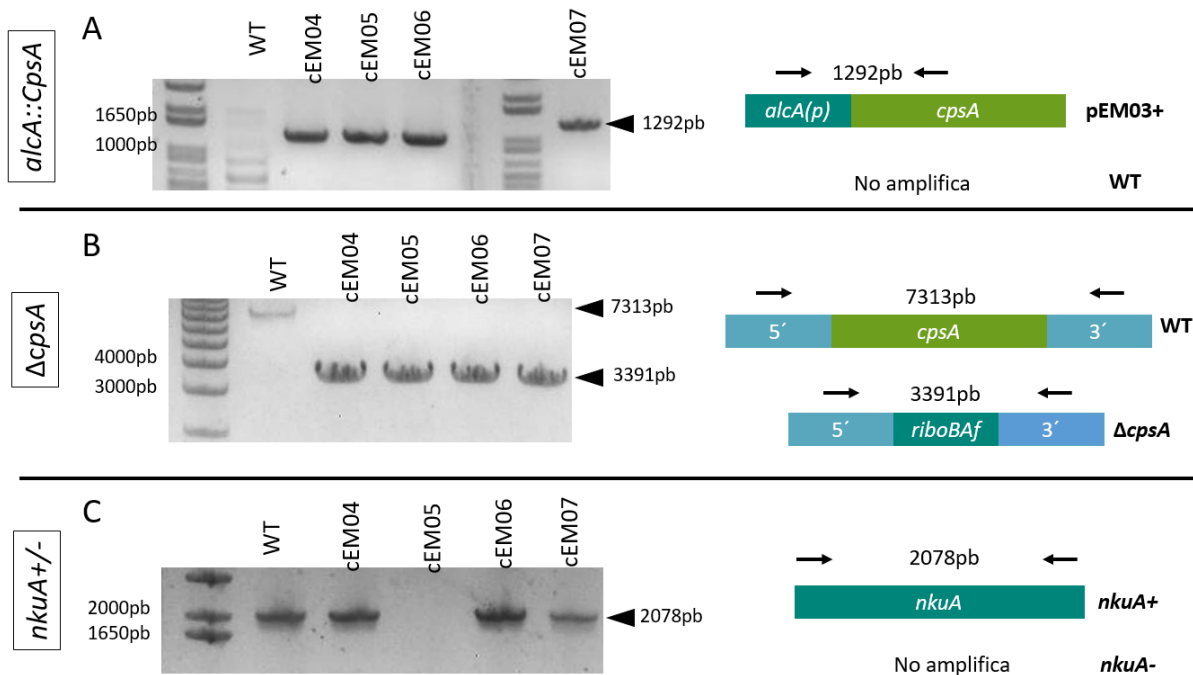


Figura 19. Comprobación por PCR de la presencia de la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP*, la ausencia del gen *cpsA* nativo y la presencia del gen *nkuA* en las cepas cEM04-cEM07. Panel A. Comprobación de la presencia de la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP*. En el gel: productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de las cepas silvestre (carril 2) y cEM04-cEM07 (carriles 3-5 y carril 7). Según el esquema a la derecha del gel, cuando la cepa tiene la construcción *alcA(p)::cpsA* se espera un producto de 1292 pb con el par de oligonucleótidos empleados, mientras que si la cepa carece de la construcción, no se obtiene producto. **Panel B.** Comprobación de la ausencia del gen *cpsA* nativo. En el gel: Productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de una cepa silvestre (carril 2) y de las cepas cEM04-cEM07 (carriles 3 a 6). Como muestra el esquema a la derecha del gel, cuando la cepa tiene el gen *cpsA* nativo se amplifica un producto de 7313 pb con el par de oligonucleótidos usados, mientras que si la cepa no tiene el gen nativo se obtiene un producto de 3391 pb. **Panel C.** Comprobación de la presencia de *nkuA*. En el gel: productos de PCR obtenidos a partir de genómico de una cepa silvestre (carril 2) y de genómico de las cepas cEM04-cEM07 (carriles 3 a 6). Como muestra el esquema a la derecha del gen, cuando la cepa tiene el gen *nkuA* se amplifica un producto de 2078 pb con el par de oligonucleótidos usados, mientras que si la cepa es $\Delta nkuA$ no se obtiene producto. De las cepas analizadas la cEM05 es la única $\Delta nkuA$.

Las cepas cEM04 a cEM07 tuvieron integrada la construcción *alcA(p)::cpsA* (fig. 19, panel A) presente en el plásmido pEM03 y fueron $\Delta cpsA$ (fig. 19, panel B). De la reacción diagnóstica para *nkuA*, las cepas cEM04, cEM06 y cEM07 fueron *nkuA+*, mientras que la cepa cEM05 fue *nkuA-* (fig. 19, panel C).

Para evaluar cuantitativamente que tanto la construcción *alcA::cpsA::mRFP* podía recuperar la esporulación en ausencia del gen *cpsA* nativo, se inoculó la cepa cEM03 (sin el gen nativo y con la construcción) en medio sólido con distintas fuentes de carbono que tienen los siguientes efectos sobre el promotor *alcA* en medio sólido:

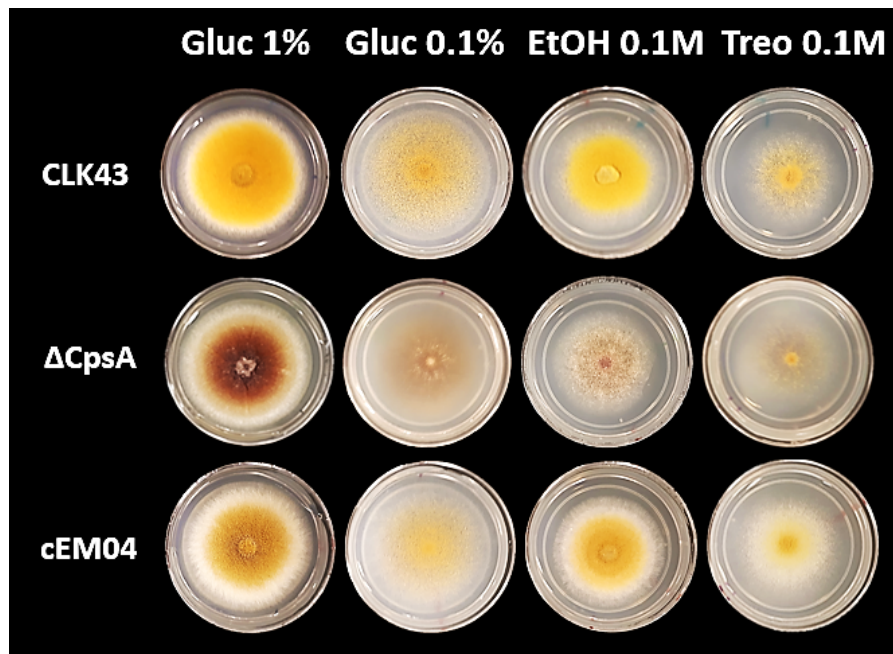
1. Glucosa al 1 %: el promotor está casi reprimido
2. Glucosa al 0.1 %: el promotor se desreprime
3. Etanol 0.1 %: el promotor se induce
4. Treonina 0.1M: el promotor se induce fuertemente

Para comparar, se inocularon también las cepas CLK43 (silvestre) y $\Delta cpsA$. Tras haber inoculado 1×10^4 esporas de cada una de las cepas, por triplicado, se incubaron por 5 días a 37 °C, después de lo cual se colectaron los conidios producidos por cada colonia y se contaron por triplicado usando un hemocitómetro.

Como se puede ver en la **fig. 20**, la fuente de carbono cambia la morfología de las colonias (**panel A**) y el número de esporas producidas (**panel B**) por éstas. Como punto de partida de comparación, en glucosa al 1 % la cepa silvestre mostró la mayor producción de esporas, cuando se creció en treonina se observó la menor producción de esporas, mientras que con etanol y con glucosa 0.1% como fuente de carbono se muestra una morfología y producción de esporas intermedias. En todos los medios probados, la cepa cEM04 ($\Delta cpsA$ con la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP*) muestra una coloración amarilla, que indica la formación de esporas, mucho mayor que la de la cepa $\Delta cpsA$ y más cercana a la de la cepa silvestre. Además, CEM04 no acumula el pigmento café característico de las mutantes $\Delta cpsA$ (**fig. 20, panel A**). Por otro lado, la inducción gradual de la construcción *cpsA::mRFP* restaura progresivamente la conidiación de una mutante $\Delta cpsA$, **mientras que** ninguna de las fuentes de carbono producen una mejoría en el fenotipo de la cepa $\Delta cpsA$ (**fig. 20, panel A**). Así, cEM04 en etanol como fuente de carbono produce una cantidad de esporas más cercana a la de la cepa silvestre, mientras que en treonina como fuente de carbono, la cepa cEM04 produce incluso más esporas que la cepa silvestre (**fig. 20, panel B**). Por otro lado en glucosa, etanol y treonina como fuentes de carbono se observó la formación de micelio “fluffy” (algodonoso) en la periferia de las colonias de la cepa cEM04 pero no de la CLK43 o de la $\Delta cpsA$. Esto último señala que en esta región de la colonia hay crecimiento de micelio aéreo sin la producción de conidios o con una pigmentación retrasada de los mismos.

Recapitulando, este conjunto de resultados indican que la construcción *cpsA::mRFP* es capaz de recuperar parcialmente la conidiación en *A nidulans*, así como a 37 °C, de suprimir la formación de pigmento café que se observa en la cepa $\Delta cpsA$, y de hacerlo a niveles bajos de expresión, mientras que niveles más elevados de expresión parecen incrementar la conidiación.

A



B

PRODUCCIÓN DE ESPORAS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

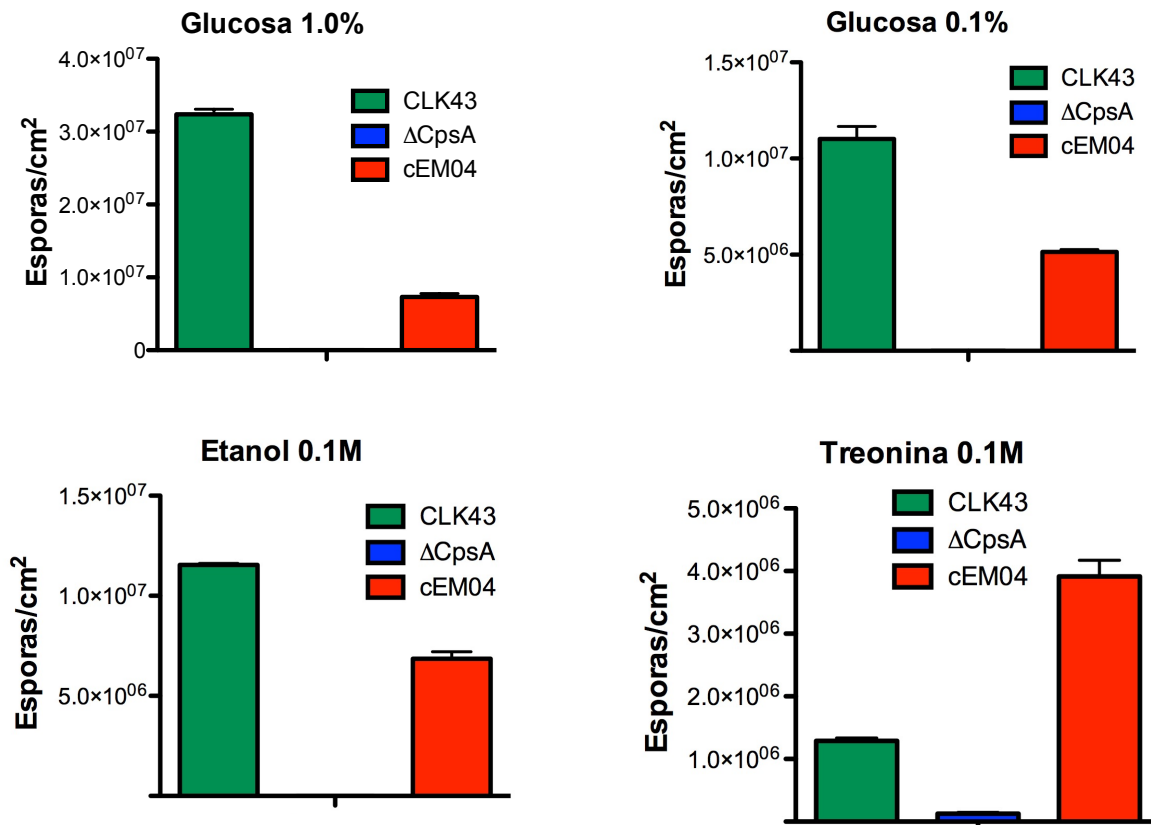


Figura 20. La inducción gradual de la construcción *cpsA::mRFP* restaura progresivamente la conidiación de una mutante $\Delta cpsA$. Se inocularon 1×10^4 esporas de las cepas CLK43 (WT), $\Delta cpsA$ y cEM03 ($\Delta cpsA$, con la construcción *alcA::cpsA::mRFP*), por triplicado en cajas con medio suplementado y se fotografiaron las cepas tras 5 días de crecimiento a 37 °C (Panel A) y se contó la producción de esporas/cm² por triplicado. En el panel B se grafica resultado del conteo con el error estándar.

4. Localización celular de CpsA

Como se ha mostrado hasta el momento, se obtuvo un vector para sobreexpresar CpsA etiquetada con mRFP y se comprobó que no hay mutaciones en el mismo y que es capaz de recuperar considerablemente la ausencia del gen nativo.

El primer experimento que se realizó con el fin de observar la localización celular de la construcción CpsA::mRFP fue inocular esporas de la cepa cEM03 en medio sólido con treonina como fuente de carbono (que como se vio en un apartado anterior, induce fuertemente al promotor *alcA*) a 37 °C por 18 h, después de lo cual se realizaron observaciones con microscopía confocal, tanto de la parte distal de la colonia (que corresponde a la región de crecimiento) como en regiones centrales. Como puede verse en la fig. 21 la señal roja que corresponde a CpsA::mRFP, se encontró distribuida en toda la hifa, mostrando cierto enriquecimiento en algunos cuerpos discretos, los cuales mostraron una gran movilidad bidireccional cuando se observan in vivo (no se muestra).

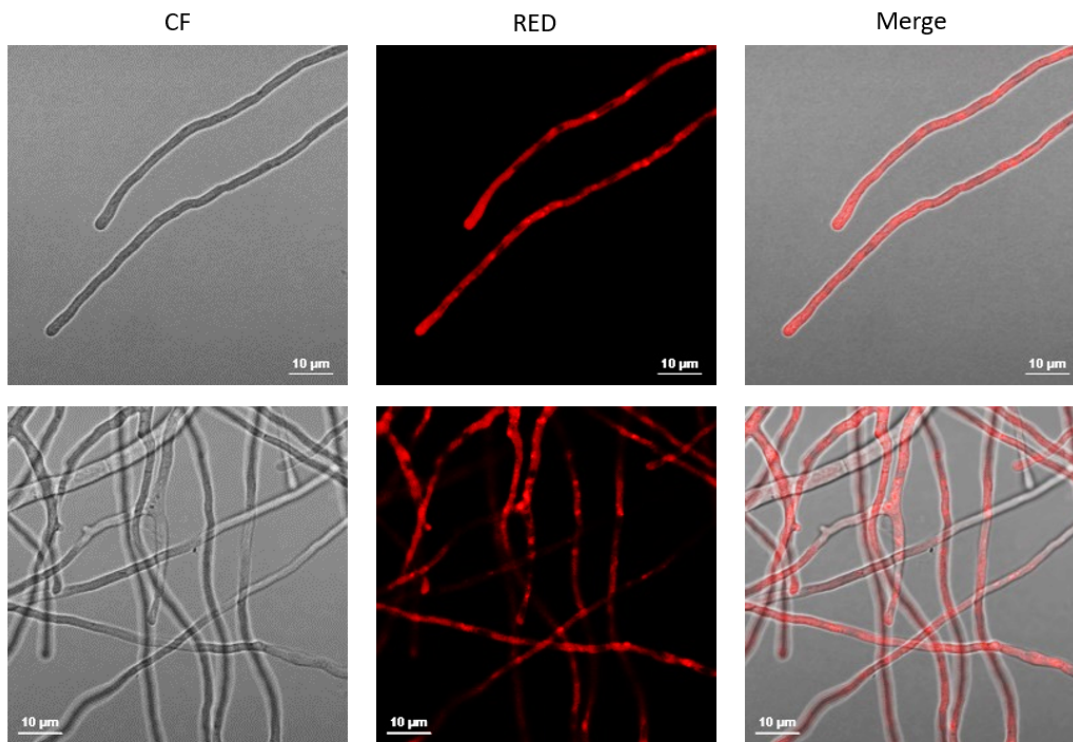


Figura 21. Localización de CpsA::mRFP en la cepa cEM03, tras la inducción del promotor *alcA*. La cepa cEM03 se creció en medio sólido con treonina como fuente de carbono, la cual induce de manera fuerte al promotor *alcA(p)*. Después de 18h se tomaron muestras y se observaron con microscopía confocal. CpsA::mRFP se localiza en estructuras discretas y ampliamente distribuidas en el interior celular, tanto en la punta de las hifas (paneles superiores), como en regiones más hacia el centro de la colonia (paneles inferiores).

En estas observaciones iniciales se notó que hay regiones de las hifas en las que la señal es muy débil o ausente y se pensó que éstas podrían corresponder a núcleos. Para verificar esto se realizó la observación en las mismas condiciones de crecimiento (en medio sólido con treonina como fuente de carbono y 18 h de crecimiento a 37 °C) y se trató la muestra con una solución de montaje con DAPI. Como se puede observar en la **fig. 22**, en efecto, los sitios con señal baja o ausente corresponden a núcleos. Este resultado indica que, en estas condiciones, CpsA no se localizó en el núcleo.

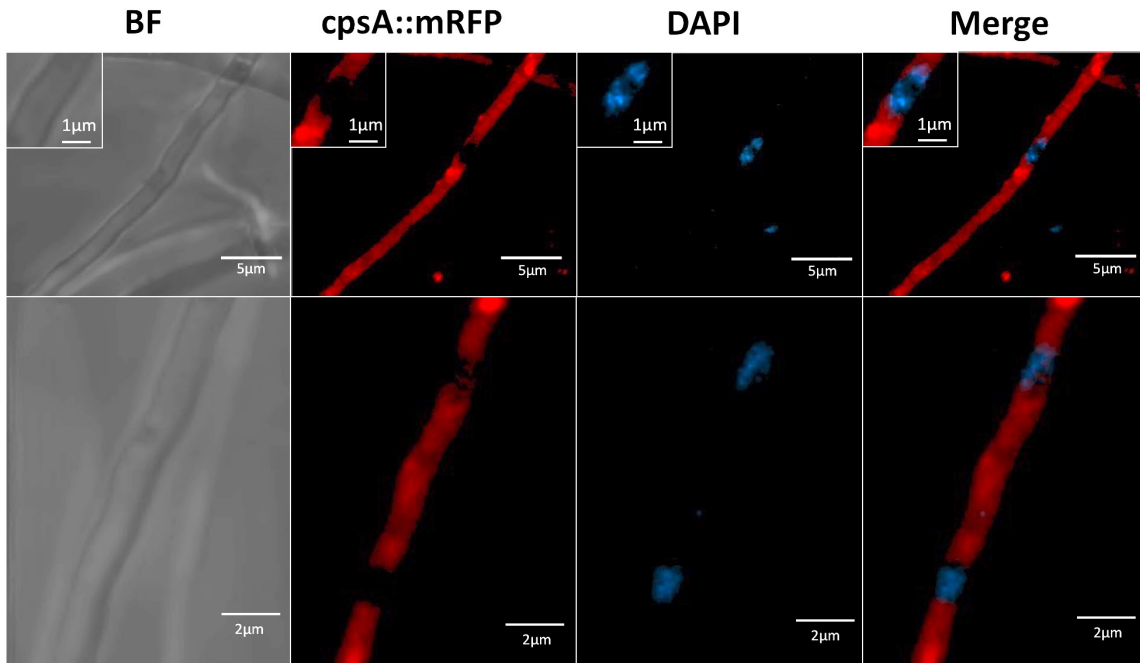


Figura 22: Tras su sobreexpresión, CpsA::mRFP no se detecta en el núcleo celular. La cepa cEM03 se creció en medio sólido con treonina como fuente de carbono, la cual induce de manera fuerte al promotor *alcA(p)*. Después de 18 h se tomaron muestras, se trataron con una solución de montaje y se observaron con microscopía confocal. Se muestran dos campos (superior e inferior) para ejemplificar las observaciones realizadas. Las imágenes mostradas corresponden a la reconstrucción de 10 fotografías tomadas en diferente plano. En cuadros chicos de las fotografías superiores se muestra el detalle de la localización.

Como ya se mencionó, además de la localización citoplasmática de la señal roja correspondiente a CpsA::mRFP, también se observó un enriquecimiento en cuerpos discretos y ampliamente distribuidos. Pensando que éstos podrían corresponder al sistema vacuolar del hongo, se realizaron observaciones de las hifas en las mismas condiciones anteriores pero ahora se realizó tinción de las hifas con Oregon Green™ 488 de Invitrogen™, que marca al sistema vacuolar al acumularse en las vacuolas y emitir fluorescencia en el rango verde en un entorno ácido. Como se puede observar en la **fig. 23**, muchos, pero no todos los puntos de enriquecimiento de la señal CpsA::mRFP se sobrelaparon con la señal verde. Esto indica que, tras una inducción crónica fuerte

y prolongada (18 h de crecimiento en medio sólido con treonina como fuente de carbono), una parte de la construcción CpsA::mRFP se acumuló en el sistema vacuolar del hongo.

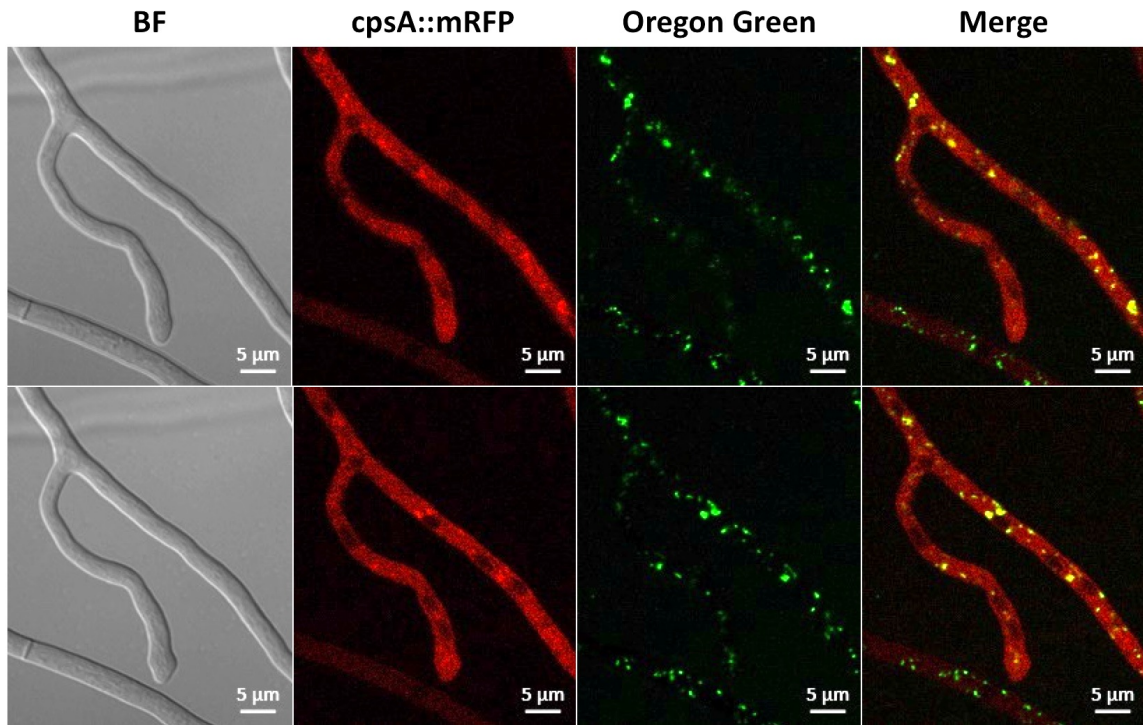


Figura 23: Tras su sobreexpresión, la señal de CpsA::mRFP se enriquece en estructuras que corresponden al sistema vacuolar. La cepa cEM03 se creció en medio sólido con treonina como fuente de carbono, la cual induce de manera fuerte al promotor *alcA(p)*. Después de 18 h de se tomaron muestras y se les añadió medio líquido adicionado con Oregon Green 488 de Invitrogen, después de lo cual se realizaron las observaciones. Se muestran dos tiempos diferentes de un *timelapse*, que son representativos de la observación realizada. Debajo de la etiqueta de Merge se muestran ambos canales y en amarillo los sitios de colocalización.

La expresión de la construcción CpsA::mRFP por un tiempo prolongado podría llevar a la acumulación de la señal roja en el sistema vacuolar, debido a la degradación de la proteína sobreexpresada. Considerando esto, decidimos observar la localización celular tras una inducción gradual de CpsA::mRFP. Para esto, se inocularon esporas de la cepa cEM03 en medio líquido adecuadamente suplementado y con glucosa como fuente de carbono. Tras 16 h de crecimiento con agitación se colectó el micelio y se transfirió a medio con treonina como fuente de carbono. Después se tomaron muestras cada 30 min y se observaron mediante microscopía confocal. Como se puede ver en la **fig. 24**, a los 30 min la señal CpsA::mRFP fue prácticamente indetectable, mientras que a partir de los 60 min se comenzó a apreciar la señal roja, misma que desde estos tiempos ya mostró un enriquecimiento en algunas regiones del citoplasma celular. A los 90 y 120 min se detectó una señal muy alta, pero el patrón es esencialmente el mismo que el observado a los 60 min. Estos resultados indican que aún con bajos niveles de expresión, la construcción

CpsA::mRFP mostró una distribución heterogénea a lo largo de las hifas, lo cual sugiere que este patrón no se debe a la acumulación de la construcción CpsA::mRFP.

Para determinar la localización celular de CpsA en conidióforos en desarrollo, se observaron conidióforos jóvenes de la cepa cEM03 inoculada en glucosa como fuente de carbono. Como se mencionó anteriormente, el promotor *alcA(p)* se desreprime de manera natural en el micelio aéreo. Tras 24 h de crecimiento se tomó una muestra y se realizó una tinción con Oregon GreenTM 488 de InvitrogenTM. Como puede observarse en la **fig. 25**, en un conidióforo en estado intermedio de desarrollo, en la vesícula y las métulas, la mayor parte de la señal CpsA::mRFP se encontró en cuerpos globulares los cuales corresponden a vacuolas.

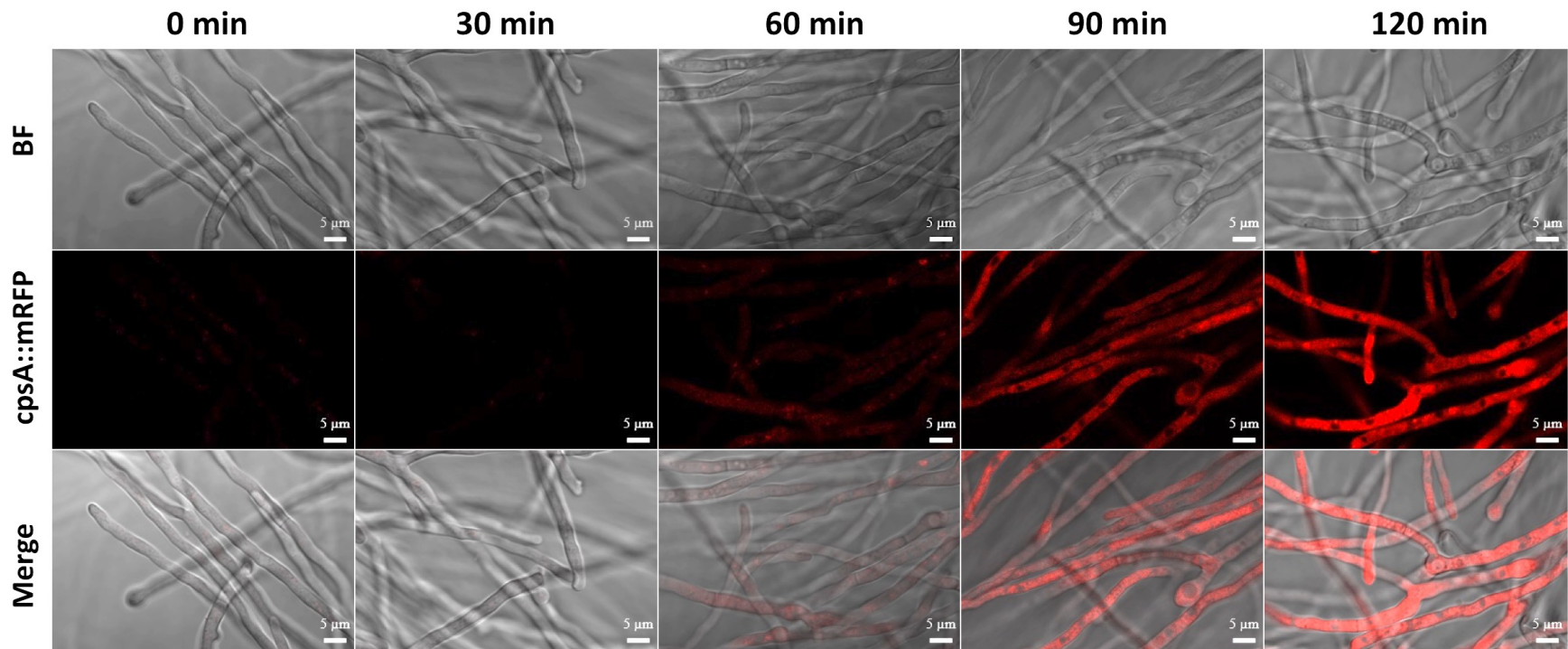


Figura 24: *Time-lapse* de acumulación de la señal CpsA::mRFP entre 0-120 minutos tras su inducción en medio líquido. La cepa cEM03 se creció en medio líquido adecuadamente suplementado con glucosa como fuente de carbono a una densidad de 1×10^6 esporas por mililitro, después de lo cual se incubó a 37 °C con agitación a 300 rpm por 16 h. Transcurrida esta incubación, el micelio se transfirió a medio líquido con treonina como fuente de carbono. Se tomó una muestra inicial (0 min) y cada 30 min se tomaron muestras hasta 120 min. Estas muestras se observaron con microscopía confocal en una región cercana a la periferia del pellet. En los paneles se muestra el campo claro (BF), el campo rojo y el merge de ambos. Todas las fotografías se tomaron con las mismas configuraciones en el microscopio y fueron editadas con el mismo método, de modo que pudieran ser comparables.

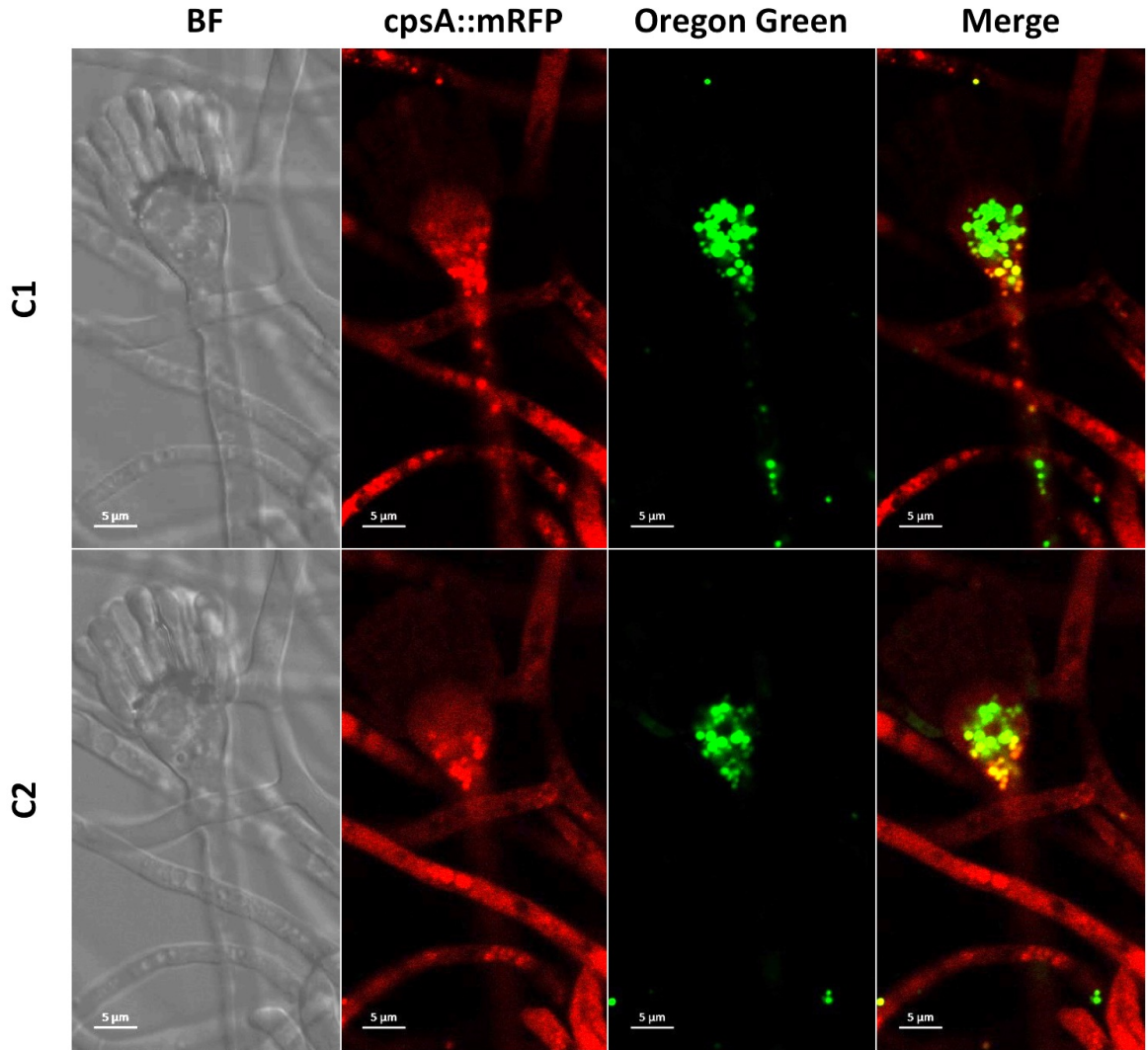


Figura 25: En conidióforos en estado intermedio de desarrollo, la señal *CpsA::mRFP* se acumula en vacuolas esféricas. La cepa cEM03 se creció en medio sólido con glucosa como fuente de carbono, después de lo cual se incubó a 37 °C por 24h. Tras esto se tomaron muestras de una región de la colonia con conidióforos jóvenes, mismas que se trataron con Oregon Green 488 de Invitrogen, disuelto en medio líquido adecuadamente suplementado y se observaron con microscopía confocal. Sobre la muestra se ejerció presión para poner en plano horizontal los conidióforos. Se muestran dos cortes representativos del total de cortes visuales realizados (C1 y C2). En el panel “Merge” en color amarillo se observan los sitios en los que co-localizan las señales roja y verde.

5. Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de *CpsA*

Como se mencionó anteriormente, el promotor *alcA* se desreprime de manera natural durante el desarrollo de los conidióforos, en medio sólido. Teniendo esto en mente, se observó que la cepa con la construcción *alcA::cpsA::mRFP* genera estructuras sexuales de manera prematura al crecer en 1 % de glucosa como fuente de carbono. Como se puede observar en la **fig. 26**, tanto la cepa (cEM03; contiene la construcción mencionada en un fondo silvestre), como la cepa cEM04 (con la

construcción en un fondo $\Delta cpsA$) comenzaron a formar células Hülle a los tres días de crecimiento, mientras que una cepa silvestre sin la construcción *alcA::cpsA::mRFP* (CLK43) no formó estas estructuras (fotos superiores). Más aún, tras haber sellado las cajas, lo cual induce la formación de estructuras sexuales, observamos que a los dos días se formaron una alta cantidad de cleistotecios en las cepas cEM03 y cEM04, mientras que en este tiempo la silvestre prácticamente no mostró desarrollo de dichas estructuras (fotos inferiores de la figura).

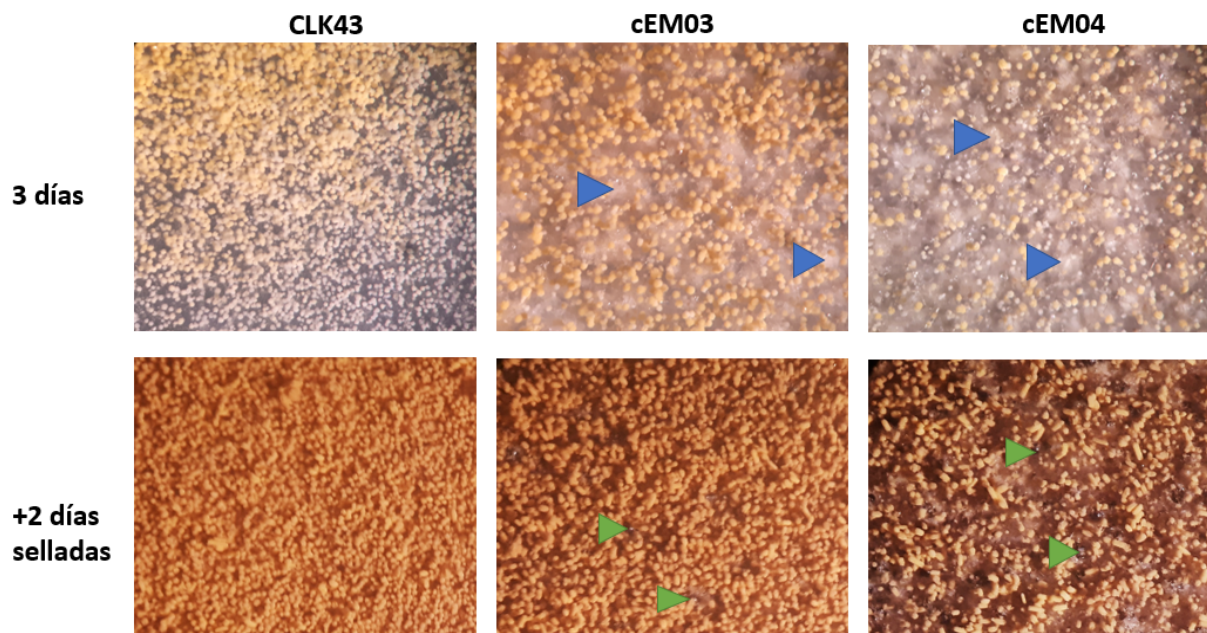


Figura 26. La expresión de *alcA::cpsA::mRFP* induce prematuramente la formación de estructuras sexuales tanto en un fondo silvestre (cEM03) como en un fondo $\Delta cpsA$ (cEM04). Se inocularon esporas de las cepas indicadas (CLK43 que es silvestre, cEM03 que contiene la construcción *alcA::cpsA::mRFP* en un fondo silvestre y cEM04 que contiene la construcción *alcA::cpsA::mRFP* en un fondo $\Delta cpsA$), en medio con glucosa al 1 % como fuente de carbono. Se incubaron por 3 días a 37 °C después de lo cual se fotografiaron (fotografías superiores) Como se puede observar, las cepas que contienen la construcción mencionada forman células Hülle, que se observan como estructuras redondas y algodonosas (flechas azules). Tras esto, se sellaron las cajas, se incubaron a la misma temperatura por dos días y se fotografiaron. Las cepas que contienen la construcción formaron cleistotecios, que se observan como estructuras pigmentadas y esféricas (flechas verdes), mientras que la cepa silvestre no formó células Hülle ni cleistotecios en estas condiciones.

6. Expresión del gen *cps-1* de *N. crassa* en *A. nidulans*.

Con el objetivo de evaluar si el gen *cps-1* de *N. crassa* es capaz de reemplazar funcionalmente al gen *cpsA* de *A. nidulans*, se diseñó un plásmido usando el vector parental pEM03 (mismo que se utilizó en este trabajo para sobreexpresar *cpsA* de *A. nidulans*), usando la metodología Infusion® HD de Clontech ya descrita (detalles de la obtención del plásmido en Métodos).

El plásmido pEM05 (fig. 11) se utilizó para transformar la cepa RMS011 (auxótrofa a paba y arginina) por electroporación. Se obtuvieron nueve transformantes capaces de crecer en medio sin arginina, mismas a las que se les realizaron 3 pases por colonia aislada y posteriormente se les realizó una reacción de PCR diagnóstica para verificar la presencia de la construcción. Como muestra la fig. 27, seis de estas dieron resultado positivo (que se observa como la presencia de una banda de 1441 pb) y se les designó con el nombre cEM08-cEM13.

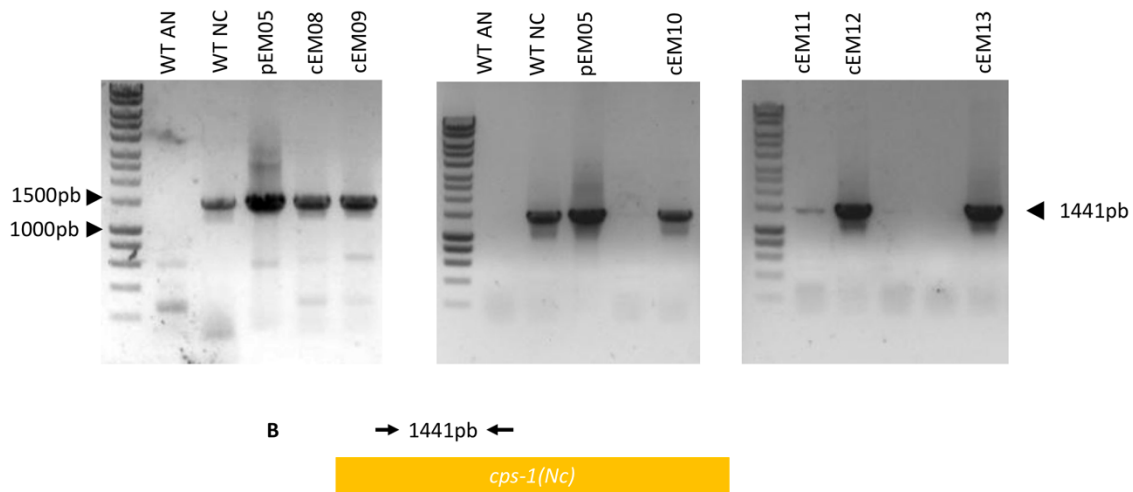


Figura 27. Comprobación de la presencia de la construcción *alcA::cps-1(Nc)::mRFP* en *A. nidulans*. (A) Primer gel de izquierda a derecha: En el primer carril está la reacción usando DNA de una cepa silvestre (11035) como control negativo, en el segundo y tercero están como controles positivos las reacciones usando DNA silvestre de *N. crassa* y del plásmido usado para la transformación (pEM05). En los siguientes dos carriles está el DNA genómico de dos transformantes positivas. **Segundo y tercer gel:** los primeros tres carriles muestran las reacciones usando los mismos controles del primer gel y en los siguientes carriles están las reacciones usando DNA genómico de diferentes transformantes obtenidas. En (B) se esquematiza la reacción diagnóstica, que cuando es positiva genera una banda de 1441 pb.

Para determinar si la construcción *alcA::cps-1::mRFP* (con el gen de *N. crassa*) puede reemplazar al gen nativo de *A. nidulans*, se realizaron cruza entre las cepas cEM08 y cEM09 (obtenidas a partir de la transformación con el plásmido) y la cepa $\Delta an0842-4$ (*pyrG89 pyrO44 riboB2 $\Delta nkuA::argB veA1 \Delta an0842::AfriboB$*), la cual carece del gen *cpsA*, tal como se hizo anteriormente para probar la funcionalidad de la construcción con el gen de *A. nidulans*. Se obtuvieron cleistotecios híbridos (con ascosporas provenientes de la cruce de ambas cepas parentales) y la progenie se plaqueó en medio con los suplementos requeridos por ambas cepas parentales, para obtener el patrón de segregación completo.

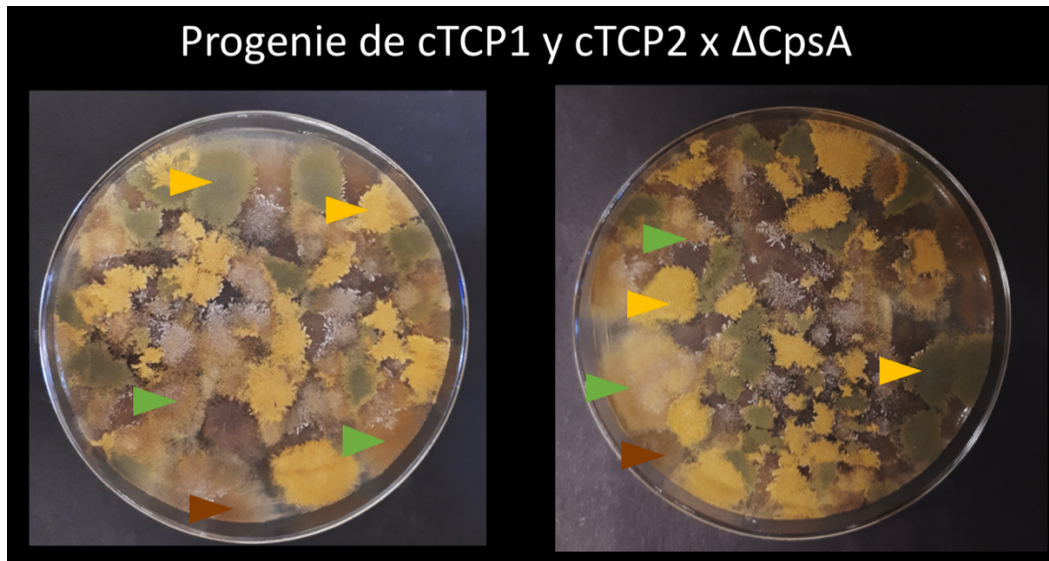


Figura 28. Patrón de segregación de la cruce entre una cepa $\Delta cpsA$ y una transformante con la construcción $alcA::cps-1(Nc)::mRFP$. Se plaquearon 50 μL de una suspensión de ascosporas obtenidas de la cruce sexual entre la cepa $\Delta cpsA$ (*pyrG89*, *pyroA4*, *riboB2*, $\Delta nkuA::argB$, *veA1*, $\Delta anO842::AfriboB$) y las cepas cEM08 o cEM09 (*pabaA1*, *yA2*, $\Delta arg::trpC\Delta B$, *veA1*, *trpC801*, $argB::alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP$), en medio con glucosa como fuente de carbono y suplementado con PABA. Después de esto se incubaron 4 días a 37 °C y a temperatura ambiente por dos días más y se fotografiaron. Como se observa, la progenie muestra diversos fenotipos: uno con conidiación claramente silvestre (**flechas amarillas**), otros con un fenotipo $\Delta cpsA$ (**flechas cafés**), mientras que otros muestran un fenotipo con esporulación amarilla tenue (**flechas verdes**). Se seleccionó este último tipo de progenie, considerando que podrían corresponder a cepas carentes del gen *cpsA* nativo con la construcción $alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP$.

En la **fig. 28** se muestra una fotografía representativa del patrón de segregación de la cruce mencionada. Muy similar a lo observado en la cruce con las transformantes que contienen el gen nativo, se observa que la progenie tuvo un fenotipo claramente silvestre (flechas amarillas), un fenotipo claramente $\Delta cpsA$ (flechas cafés) o un fenotipo intermedio (flechas verdes), en el que toda la colonia se ve esporulada, pero con menor densidad que una silvestre. Este patrón de segregación sugiere que al igual que con el gen *cpsA* nativo, niveles bajos de expresión de la construcción $cps-1(Nc)::mRFP$ en un fondo $\Delta cpsA$ fueron suficientes para rescatar parte de la esporulación.

Para obtener cepas isogénicas, se plaquearon ascosporas de las cruces mencionadas en medio suplementado únicamente con ácido para-aminobenzóico, para seleccionar cepas solo con la auxotrofia por "paba" (alelo *pabaA1*). Se seleccionaron 13 cepas con el fenotipo intermedio mencionado anteriormente y se crecieron por duplicado en medio sin suplementos para descartar aquellas cepas sin la mutación *pabaA1*. Se descartaron 4 cepas capaces de crecer sin el suplemento y posteriormente se realizó un pase adicional para colonia aislada de 5 de las cepas que sí requirieron el suplemento. De manera preliminar, estas cepas se nombraron TCI1–TCI–5.

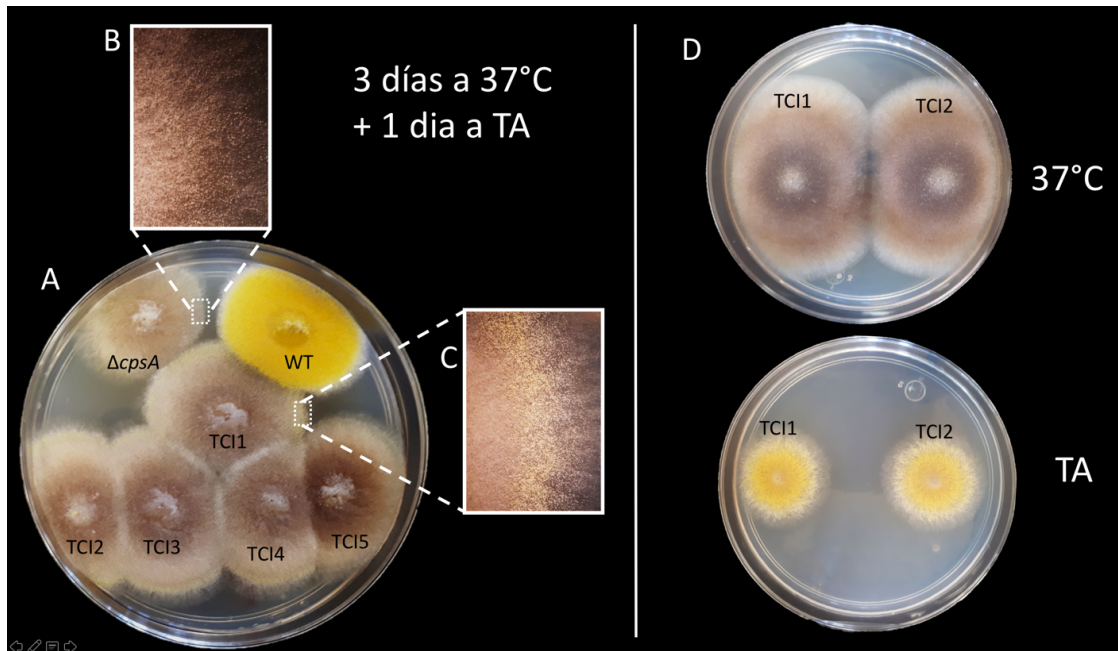


Figura 29. Parte de la progenie de la cruce $\Delta cpsA$ x cTCP1 muestra una conidiación sensible a la temperatura. Panel izquierdo: se inocularon las cepas $\Delta cpsA$, WT y las cepas TCI1–5 (descendientes con fenotipo de conidiación intermedio) y se crecieron por 3 días a 37 °C, después de lo cual se transfirieron a temperatura ambiente por un día más. Tras esto se fotografió la caja (A) así como acercamientos de la periferia de la colonia de la cepa $\Delta cpsA$ y TCI1 en el microscopio estereoscópico (B y C). Panel derecho: Se inocularon las cepas TCI1 y TCI2 en cajas Petri por duplicado, una de las cuales se incubó a 37 °C y la otra a temperatura ambiente, por 4 días, después de los cuales se fotografiaron.

Inesperadamente, se observó que después de 3 días a 37 °C, el fenotipo de las cepas seleccionadas era muy parecido al de una mutante $\Delta cpsA$. Sin embargo, a menor temperatura (temperatura ambiente), dichas cepas comenzaban a desarrollar conidióforos con pigmentación amarilla en la periferia de la colonia, como se puede ver en la **fig. 29 (A y C)**. Aunque la conidiación de la mutante $\Delta cpsA$ también mejoró un poco a temperatura ambiente (**fig. 29, A y B**), la diferencia con las cepas seleccionadas fue muy clara. Para comprobar este efecto de la temperatura sobre la conidiación, se inocularon las cepas TCI1 y TCI2 en cajas Petri por duplicado, una de las cuales se incubó a 37 °C y la otra a temperatura ambiente. Tras 4 días de crecimiento se observó en las cepas TCI1 y TCI2 un fenotipo $\Delta cpsA$ a 37 °C y un fenotipo con mayor conidiación a temperatura ambiente, en donde también se pudo apreciar la ausencia del pigmento café que caracteriza a la mutante $\Delta cpsA$ (**fig. 29, panel D**).

Cuatro de las cepas seleccionadas con base en su fenotipo de conidiación intermedia (TCI1–4) se emplearon para extraer DNA genómico, el cual se utilizó como molde en reacciones de PCR para comprobar la presencia de la mutación $\Delta cpsA$ y la presencia de la construcción $alcA::cps-1(Nc)$. En la **fig. 30** se esquematizan las estrategias que se usaron para las reacciones diagnósticas. Para comprobar que las cepas tuvieran la construcción $alcA::cps-1(Nc)$ integrada se utilizaron un par

de oligonucleótidos internos a la secuencia del gen *cps-1(Nc)* que amplifican un fragmento de 1580pb si la construcción está presente (fig. 30, A). Para comprobar que las cepas fueran $\Delta cpsA$ se utilizaron un par de oligonucleótidos externos al gen, de modo que el gen nativo remplazado por el cassette *RiboBAF* se amplificara como una banda de 3391pb (fig. 30, B). Las cepas TCI1, TCI2 y TCI4 tienen integrada la construcción *alcA(p)::cps-1(Nc)* (fig. 30, panel A) presente en el plásmido pEM05 y son $\Delta cpsA$ (fig. 30, panel B). A estas cepas se les nombró cEM14 a cEM16.

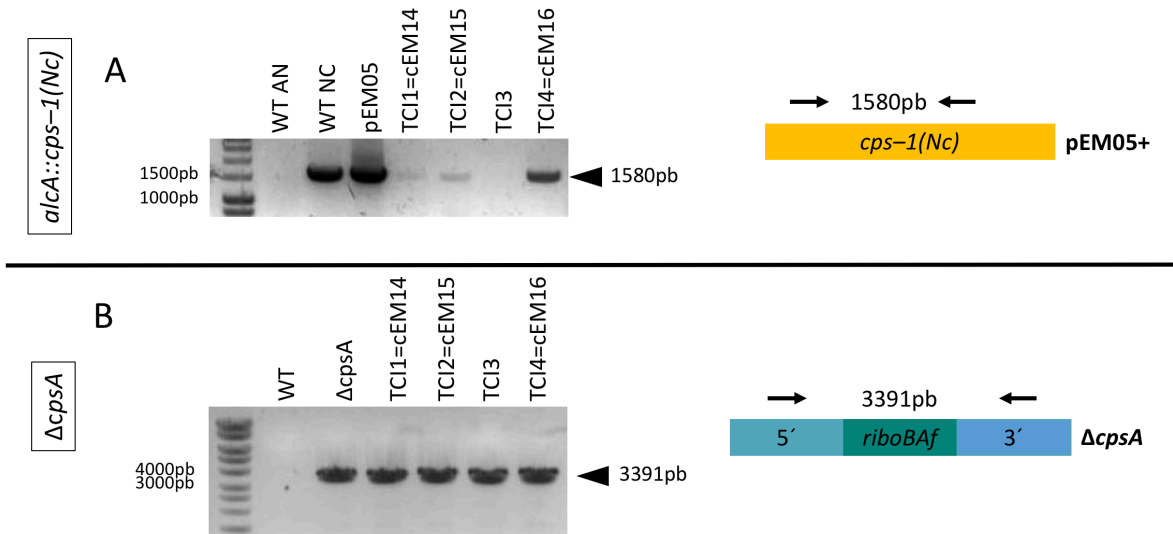
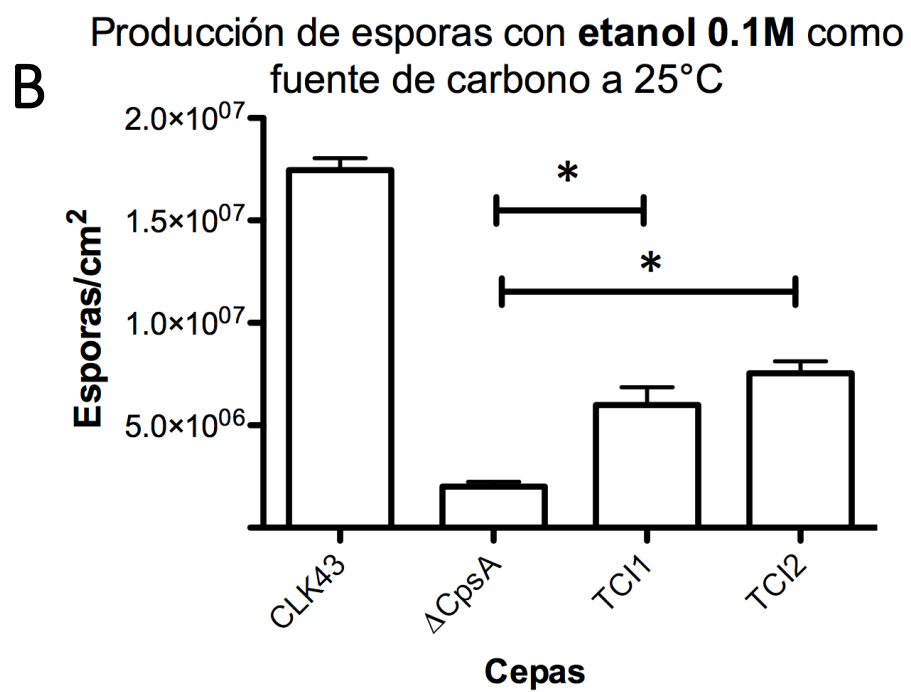
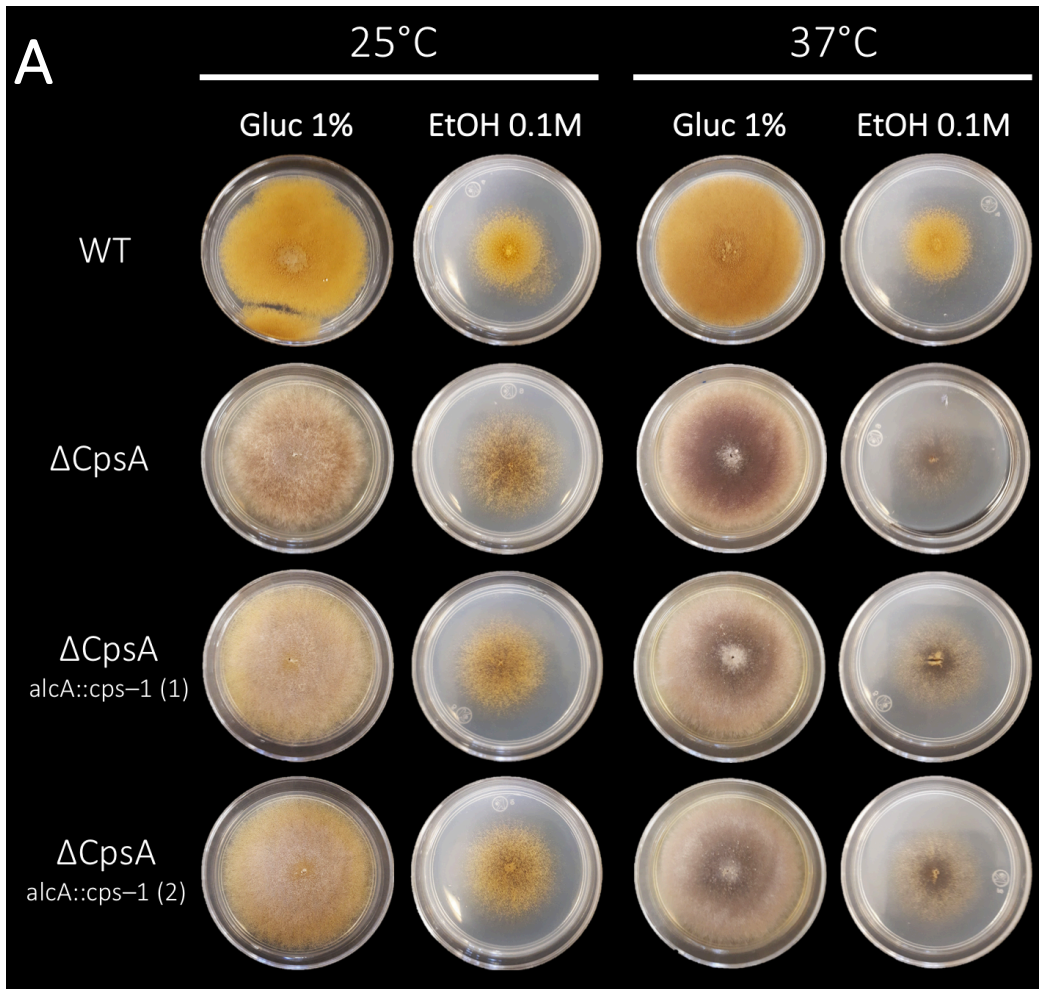


Figura 30. Comprobación de la presencia de la construcción *alcA::cps-1::mRFP* y la ausencia del gen *cpsA* nativo por PCR. (A) Comprobación de la presencia de la construcción *alcA::cps-1(Nc)*. En el gel: Productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de la cepa silvestre de *A. nidulans* (carril 2), silvestre de *N. crassa* y el plásmido pEM05 (usado para la transformación) como controles positivos (carriles 3 y 4) y genómico de las 4 cepas con fenotipo intermedio de conidiación (carriles 5 a 8). Como se esquematiza a la derecha del gen, cuando la cepa tiene el gen *cps-1(Nc)* se espera un producto de 1580 pb, mientras que si la cepa no contiene el gen no se espera producto. (B) Comprobación de la ausencia del gen *cpsA* nativo. En el gel: Productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de una cepa silvestre (carril 2), genómico de una $\Delta cpsA$ (carril 3) y de las cepas con fenotipo intermedio (carriles 4 a 8). Como muestra el esquema a la derecha del gel, cuando la cepa carece del gen nativo se obtiene un producto de 3391 pb.

Para evaluar cuantitativamente que tanto la construcción *alcA::cps-1(Nc)::mRFP* puede rescatar la esporulación en ausencia del gen *cpsA* nativo, se realizaron pruebas de crecimiento en medio con glucosa 1 % y etanol 0.1M como fuentes de carbono, con las cepas TCI1 y 2 ($\Delta cpsA$ *alcA::cps-1(Nc)::mRFP*). Para considerar el efecto de la temperatura en estas cepas, se realizó el experimento a 25 °C y a 37 °C. Para comparar, también se inocularon las cepas CLK43 (silvestre) y $\Delta cpsA$. Tras haber inoculado 1×10^4 esporas de cada una de las cepas por triplicado, se incubaron por 7 días, después de lo cual se colectaron los conidios producidos por cada colonia y se contaron por triplicado usando un hemocitómetro.



C

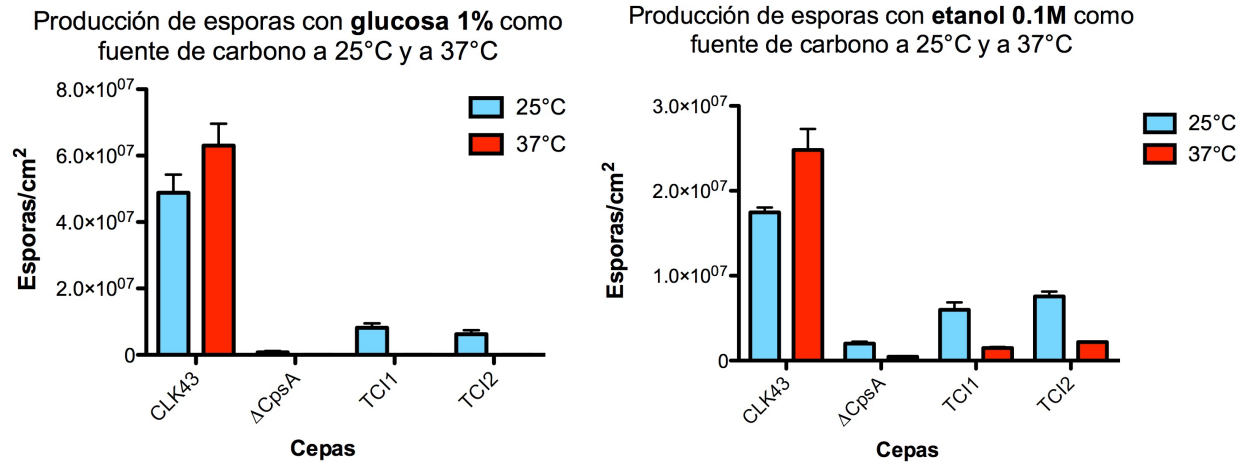


Figura 31. La construcción *alcA(p)::cps-1::mRFP* restaura parcialmente la conidiación de una mutante $\Delta cpsA$ cuando se utiliza etanol como fuente de carbono y una temperatura de crecimiento de 25 °C. Se inocularon 1×10^4 esporas de las cepas CLK43 (WT), $\Delta cpsA$, cEM14 y cEM16 (ambas $\Delta cpsA$, con la construcción *alcA::cps-1::mRFP*), por triplicado en cajas con medio suplementado con glucosa 1 % o etanol 0.1M como fuentes de carbono. Se fotografiaron las cepas tras 7 días de crecimiento a 25 °C y a 37 °C (panel A) y se cuantificó la producción de esporas/cm² por triplicado (gráficas del panel C). En el panel B se muestra una gráfica de la producción de esporas en etanol 0.1M como fuente de carbono y con temperatura de crecimiento de 25 °C, para enfatizar que en estas condiciones la construcción recupera de manera considerable la conidiación. Las barras con asterisco muestran una diferencia significativa ($t=4.46$ y 8.86 respectivamente, $P<0.05$). En las gráficas del panel C se puede observar el efecto de la temperatura en la conidiación.

Como se mencionó anteriormente, la glucosa reprime casi totalmente al promotor *alcA(p)*, mientras que el etanol lo induce. Considerando esto, la temperatura tuvo una influencia importante en la capacidad de la construcción *alcA(p)::cps-1::mRFP* para recuperar la conidiación de una cepa $\Delta cpsA$. Así, a 25 °C en ambas fuentes de carbono se observó una esporulación mayor a la de la cepa $\Delta cpsA$ en las cepas que contienen la construcción, mientras que a 37 °C la esporulación de estas cepas fue mínima (fig. 31, paneles A y C).

La fuente de carbono y por lo tanto los niveles de inducción de la construcción *alcA(p)::cps-1::mRFP* tuvieron un efecto importante en los niveles de recuperación del fenotipo, ya que en etanol se logra una mayor recuperación de la conidiación en comparación con glucosa, en ambas temperaturas (fig. 31, paneles A y C). La mejor recuperación de la conidiación ocurrió al crecer la cepa en etanol como fuente de carbono a una temperatura de 25 °C. (fig. 31, panel B). El grado de recuperación de la conidiación fue notable considerando que la expresión del gen *cpsA* silvestre controlado por promotor *alcA* no fue capaz de restaurar completamente la conidiación, como se aprecia en la fig. 20.

La capacidad de *cps-1* de *N. crassa* de recuperar parcialmente la conidiación en una mutante $\Delta cpsA$ de *A. nidulans* sugiere que ambas proteínas tienen una función similar. Como se ve en la **fig. 32**, el porcentaje de identidad de *cps-1* de *N. crassa* con *A. nidulans* es del 64 %. Este dato sugiere que ambas proteínas tienen una similitud funcional.

Organismo	Puntaje total	Cobertura de secuencia (%)	Identidad de secuencia (%)
<i>Neurospora crassa</i>	2252	90	64.39
<i>Coccidioides posadasii</i>	2504	90	71.77
<i>Magnaporthe oryzae</i>	2300	88	67.77
<i>Cochliobolus heterostophus</i>	2219	88	65.39
<i>Drosophila melanogaster</i>	206	54	24.42
<i>Caenorhabditis elegans</i>	197	72	23.31

Figura 32. Identidad de las secuencias de proteínas CPS-1 y Dip2 con la proteína CpsA de *Aspergillus nidulans*. Se realizó un BLAST utilizando como secuencia problema CpsA de *A. nidulans* y como organismos blanco los enlistados en la tabla, utilizando la base de datos del NCBI (Sayers *et al.*, 2019). En la tabla se incluye porcentaje total, cobertura de las secuencias y el porcentaje de identidad.

DISCUSIÓN

El gen *cpsA* muestra niveles bajos de expresión, pero su RNAm se acumula durante la conidiación y *cpsA* es necesario para la inducción del gen *brlA*, regulador maestro de la conidiación.

En este trabajo encontramos que el gen *cpsA* se expresa muy poco en las condiciones de crecimiento evaluadas (durante la germinación y crecimiento en medio líquido con agitación, y tras la exposición del cultivo a aire) y se encontró un incremento ligero de la cantidad de mensajeros en condiciones de diferenciación de estructuras de reproducción asexual. Así mismo se observó que independientemente de los niveles bajos de expresión, los defectos en la conidiación observados en mutantes $\Delta cpsA$ podrían explicarse por el hecho de que este gen es necesario para alcanzar niveles normales de expresión del regulador *brlA*. Durante la realización de este trabajo, Wang *et al.* (2016) publicaron un artículo en el que se menciona por primera vez el papel de ortólogo de *cpsA* como un gen necesario para la morfogénesis en el hongo *Magnaporthe oryzae*. El punto principal de dicho trabajo es que el gen es necesario para el desarrollo de conidióforos completos. En dicho trabajo también se determinaron los niveles de expresión de *cpsA* en diferentes momentos del desarrollo y sus resultados son similares a los nuestros: una elevación en la cantidad de transcritos de *MoCps1* durante la conidiación y niveles bajos en los conidios e hifas en crecimiento. También observaron los niveles más altos durante la formación de los apresorios, que son las estructuras infectivas con las que el hongo se establece sobre las hojas de las plantas. Los resultados de ese artículo, en conjunto con los mencionados en este trabajo, indican que *cpsA* y sus ortólogos son genes que se inducen de manera específica durante procesos de diferenciación celular.

La disminución de la expresión de *brlA* que observamos en la cepa $\Delta cpsA$ podrían deberse a una interrupción en las etapas tempranas del programa de diferenciación sexual ocasionada por la incapacidad de formar un micelio aéreo normal, como se evidencia en la **fig. 11**. Este fenotipo difiere de otras cepas del laboratorio que son capaces de formar un micelio aéreo pero este se alarga y no logran diferenciarse los conidióforos (Soid-Raggi *et al.*, 2016), mientras que en la cepa $\Delta cpsA$ se observa la incapacidad de establecer el micelio aéreo.

Por otro lado, el notable decremento en la expresión del gen *brlA* (aproximadamente 10 veces menos que en la cepa silvestre) observadas en este trabajo contrasta con los resultados publicados previamente por Wang *et al.* (2016), en donde evalúan la expresión de 6 genes relacionados con la conidiogénesis y solamente se observan diferencias ligeras en los niveles de expresión. De igual forma, en dicho trabajo se reporta una reducción de aproximadamente 10 % en la producción de esporas, mientras que nosotros observamos una disminución prácticamente total de la conidiación y la incapacidad de formar conidióforos en condiciones normales de crecimiento en el laboratorio. La discrepancia en los datos observados puede deberse entre otras cosas a que el

conidióforo de *A. nidulans* es una estructura más diferenciada que el de *M. oryzae* o a que en este organismo no existe un gen como *brlA* de *A. nidulans* que sea el regulador central de la conidiación. En conjunto los datos mencionados indican que el efecto fenotípico de la ausencia de CpsA en la regulación del desarrollo varía entre diferentes hongos filamentosos.

Un tema en común entre animales y hongos es que los genes ortólogos *cpsA* de hongos y *DIP2* de animales se requieren para el establecimiento de estructuras con polaridad celular (citas). En el caso de los hongos, en este trabajo se muestra que la mutante $\Delta cpsA$ no puede formar micelio aéreo normal y en su lugar se generan estructuras con morfologías aberrantes. Por otro lado, en mi tesis de licenciatura (Martínez, 2017) mostré que la cepa $\Delta cps-1$ forma muy poco micelio aéreo en *N. crassa*, que también es una estructura polarizada. En *A. nidulans*, las hifas de la cepa $\Delta cpsA$ crecen de manera irregular, con un fenotipo curvado, mientras que en *M. oryzae* se mostró que la mutación $\Delta MoCps1$ resulta en la incapacidad de las hifas infectivas de penetrar a las hojas de arroz (Wang *et al.* 2016). En el caso de los animales, *DIP2* se requiere para generar patrones normales de desarrollo de axones del sistema nervioso en *C. elegans* y en *D. melanogaster*, que son altamente polarizados (citas). En estos organismos la mutación resulta en el mal direccionamiento de los axones, de manera similar a lo que ocurre con el micelio aéreo de *A. nidulans*, o en la ausencia de los mismos, como ocurre con el micelio aéreo de *N. crassa*.

Localización celular de CpsA

En glucosa como fuente de carbono, en medio sólido, el promotor *alcA(p)* se desreprime en el micelio aéreo. Como se muestra en este trabajo, la cepa que contiene la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP* en un fondo $\Delta cpsA$, cultivada en glucosa como fuente de carbono, recupera considerablemente un fenotipo silvestre, pasa de producir cero conidios a recuperar parcialmente la conidiación y deja de producir pigmento café. Este dato concuerda con el patrón de expresión de *cpsA* que encontramos, poca expresión en el crecimiento vegetativo y mayores niveles durante la conidiación, y con los niveles bajos de expresión de *cpsA* que observamos, ya que la desrepresión del promotor *alcA(p)* es suficiente para recuperar considerablemente un fenotipo silvestre.

Se ha propuesto que las proteínas DIP2 tienen funciones nucleares e incluso se ha asumido que se trata de una proteína relacionada con la metilación (Larsson *et al.*, 2017). En este trabajo se muestra que en *Aspergillus nidulans* la proteína no tiene una localización nuclear. Tomando en cuenta esto y la similitud de los dominios de adenilación de la proteína con enzimas que participan en el metabolismo secundario o en la activación de sustratos carboxílicos, resulta poco probable que la proteína tenga funciones nucleares.

Por otro lado, observamos que esta proteína se localiza en el citoplasma y que se enriquece en estructuras móviles con distintas morfologías, parte de las cuales corresponden al sistema

vacuolar. Mientras que podría pensarse que la acumulación en el sistema vacuolar se debe a la sobreexpresión de la proteína, en este trabajo también mostramos que en tiempos tempranos de inducción en donde se detecta un bajo nivel de expresión, la construcción *cpsA::mRFP* no se localiza de manera homogénea en el interior celular (**fig. 24**). El sistema vacuolar tiene funciones similares a los lisosomas de animales por lo que juega papeles centrales en la degradación de proteínas, en la regulación del pH celular, en el almacenamiento de metabolitos, en el mantenimiento de la homeostasis osmótica y en el almacenamiento de iones críticos como hierro y calcio (Richards *et al.*, 2012). La función que CpsA podría tener en este organelo no está clara. Sin embargo, se ha propuesto que la dinámica vacuolar se encuentra regulada en hifas aéreas como un mecanismo de adaptación al medio respecto a la disponibilidad de nutrientes y la presión osmótica y se piensa que en el transporte de los nutrientes y los materiales para la elongación celular, existe una regulación mediada por las vacuolas (Shoji *et al.*, 2006). De manera interesante, existen algunas similitudes entre los fenotipos observados tras eliminar *CPS-1* y *NOX-1* en *N. crassa* (defectos en la conidiación sexual y asexual y defectos en la fusión celular), ya que se ha mostrado que esta última proteína se localiza principalmente en el sistema vacuolar (Cano-Domínguez *et al.*, 2019).

Asimismo, las mutantes $\Delta nox1$ en *M. grisea* son capaces de formar la estructura de penetración en las hojas llamada apresorio, pero no pueden penetrar a la planta, al igual que las mutantes $\Delta MoCps1$ (Wang *et al.*, 2016). Estos datos dejan abierta la posibilidad de que ambas proteínas participen en la dinámica vacuolar. Otro dato que podría apoyar esto es que la mutante en *MoVps41*, que es una proteína central en la biogénesis vacuolar, presenta defectos muy similares a los observados en las mutantes *MoCps1* en *M. oryzae* y a las mutantes *cpsA* en *A. nidulans* y *N. crassa*. En *M. oryzae* estos defectos son, la formación de un apresorio no infectivo y defectos en el crecimiento vegetativo, en la formación de esporas asexuales y en la reproducción (Zhang, X. *et al.* 2017). Para evaluar estas relaciones más a fondo, es necesario estudiar la dinámica vacuolar en las mutantes $\Delta cpsA$.

Recientemente se publicó un trabajo motivado por una posible relación entre mutaciones de DIP2A y el autismo, en el que se ha propuesto el mecanismo de funcionamiento a nivel molecular de las proteínas Dip2 y quizás de *cpsA*. En este trabajo encuentran que el homólogo *dip2A*, en el ratón, interactúa directamente y se requiere para la acetilación de la proteína cortactina, que es un regulador de la nucleación de actina. Observan que esta acetilación cambia la afinidad de la cortactina por la actina, lo cual resulta en cambios en la morfología sináptica. Además de encontrar la interacción de Dip2 con la cortactina, describen que la acetilación es específica (otras proteínas no son acetiladas por Dip2), que otras proteínas interactúan con Dip2 y que la región de la proteína definida como “dominio de interacción con DMAP” es suficiente para interactuar con la cortactina (Ma *et al.*, 2019). Así, Dip2 podría ser un grupo de proteínas encargadas de la acetilación de distintos blancos específicos, por medio de la actividad de sus dominios formadores de adenilato.

De esta manera, su ausencia o mutación resultaría en un daño global a la homeostasis celular y en múltiples efectos fenotípicos. Ya que esto podría ser cierto también para las proteínas CpsA, resultaría relevante estudiar la dinámica de actina en las mutantes de *A. nidulans* y *N. crassa* que se generaron en este trabajo.

Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de *cpsA* en el desarrollo sexual

Resulta interesante que los niveles bajos de expresión de la construcción *cpsA::mRFP1* que se obtienen en glucosa induzcan el desarrollo sexual, ya que la mutante $\Delta cpsA$ es incapaz de realizar desarrollo sexual. Estos resultados indican que CpsA es una proteína cuya expresión necesita regularse de manera específica durante el desarrollo sexual y como hemos visto en otras secciones de este trabajo, también para el desarrollo asexual. La relación entre genes que regulan el desarrollo sexual y asexual se mencionará en la siguiente sección.

El gen *cps-1* de *N. crassa* complementa parcialmente la función de *cpsA* en *A. nidulans*

La identidad entre *cpsA* de *A. nidulans* y *cps-1* de *N. crassa* es de 64.39 %, lo cual sugiere una similitud funcional. En este trabajo se muestra que el gen de *N. crassa* es suficiente para recuperar parcialmente la conidiación en una mutante $\Delta cpsA$ de *A. nidulans* lo cual indica que estos genes poseen funciones equivalentes en ambos organismos. Sin embargo, este efecto se observa solo a temperatura ambiente (cerca de 25 °C) y de manera preferencial tras una inducción fuerte de la construcción *cps-1-mRFP*. Entre otras cosas, esto podría indicar que el transcrito o la proteína son inestables a temperaturas mayores o una menor afinidad de CPS-1 por su substrato en *A. nidulans*, la cual se incrementaría a menor temperatura, quizás debido a la temperatura de crecimiento de *N. crassa*. Sin embargo, aún la mutante $\Delta cpsA$ de *A. nidulans* mostró una leve mejoría en la conidiación a baja temperatura en glucosa y notablemente en etanol. Esto sugiere que el proceso en el que participa *cpsA* es más importante para la conidiación a temperaturas cercanas a los 37°C.

A. nidulans y *N. crassa* divergieron de una especie ancestral hace aproximadamente 320 millones de años y sus conidióforos tienen diferencias morfológicas y ontogénicas notorias (como se detalla en la introducción). Debido al tiempo de divergencia, existen múltiples patrones de evolución de los genes que regulan la conidiación en los ascomicetos. En este contexto, resulta relevante encontrar un gen cuya ausencia provoque efectos fenotípicos en la conidiación en ambas especies y que la complementación heteróloga sea capaz de recuperar, aunque parcialmente, la conidiación. De manera interesante, parece que los genes que regulan la conidiación y que se encuentran conservados en los ascomicetos también regulan el desarrollo sexual. En la introducción de este trabajo se mencionó que las mutante $\Delta cpsA$ de *A. nidulans* y $\Delta cps-1$ de *N. crassa* se encuentran impedidas en el ciclo sexual. Ejemplos de otros genes que muestran el mismo patrón (regular el ciclo sexual y asexual) son los pares *stuA/asm-1* y *medA/acon-1* en *A. nidulans* y *N. crassa* respectivamente (Chung D. *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

1. *cpsA* es un gen requerido para el desarrollo normal en los hongos filamentosos y su ausencia resulta en múltiples defectos en la conidiación y el desarrollo sexual.
2. En *A. nidulans*, los niveles de expresión de *cpsA* son en general bajos durante el ciclo de vida y se observa una inducción durante la conidiación y en los conidios.
3. La eliminación de *cpsA* resulta en una incapacidad para formar micelio aéreo normal y tallos de conidióforos, lo cual va acompañado por una disminución drástica en los niveles del mensajero de *brlA*, regulador central del proceso de conidiación
4. Al sobreexpresar CpsA::mRFP, se localiza en a lo largo de la hifa y en el sistema vacuolar, pero no en el núcleo.
5. El ciclo sexual se encuentra regulado por niveles específicos de expresión de *cpsA*, ya que la expresión desregulada resulta en la formación prematura de cuerpos fructíferos.
6. La capacidad del gen *cps-1* de *N. crassa* de restaurar parcialmente la conidiación de una mutante $\Delta cpsA$, así como el grado de conservación de las proteínas codificadas por estos genes, indican que este gen tiene una función conservada en la regulación del desarrollo en los hongos filamentosos.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar los efectos fenotípicos de la sobreexpresión constitutiva de *cpsA*
2. Determinar si la sobreexpresión de *brlA* en cepas $\Delta cpsA$ es capaz de inducir la conidiación, para evaluar si *cpsA* es indispensable para la conidiación y si actúa en la misma vía de regulación que *brlA*.
3. Evaluar la dinámica vacuolar en mutantes $\Delta cpsA$, así como la dinámica de actina, para explorar las hipótesis de que *cpsA* podría estar ejerciendo su función molecular en el sistema vacuolar y/o participando en la acetilación de proteínas relacionadas con la dinámica de actina.
4. Evaluar función de cada uno de los dominios de la proteína CpsA.

ANEXOS

Anexo 1. Pruebas de especificidad de los oligonucleótidos diseñados para amplificar *cpsA* y de la pureza del cDNA sintetizado

Para probar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados se realizó una reacción de PCR de punto final a partir de una muestra de cDNA para cada uno de los dos pares de oligonucleótidos, misma que se corrió en un gel de agarosa al 2 % (fig. A1, panel izquierdo). También se hicieron curvas de disociación, que indican que el par es específico cuando se muestra un solo pico (fig. A1, panel derecho). Ambas pruebas indican que los oligonucleótidos diseñados son específicos para el transcrito de *cpsA* y que el cDNA no está contaminado con DNA genómico, ya que únicamente se observa una banda y un pico en cada una de las reacciones. Ya que el producto de amplificación de ambos productos incluye intrones, si hubiera contaminación el par 1 de oligonucleótidos amplificaría un producto de 146 pb y el par 2 amplificaría 179 pb.

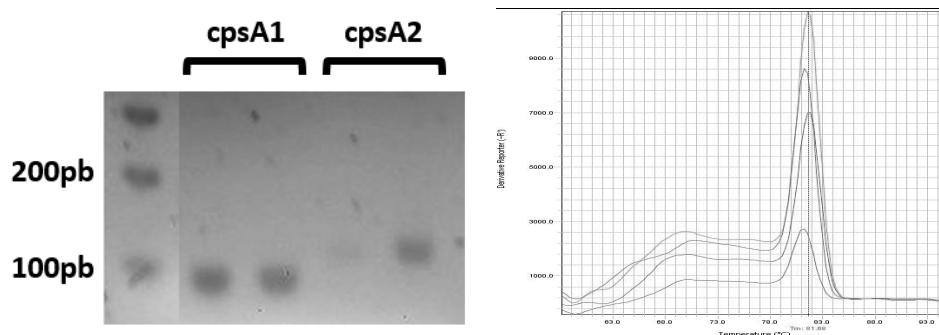


Figura A1. Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del transcrito de *cpsA* son específicos. **Izquierda:** Producto de PCR de punto final del transcrito de *cpsA* a partir de una muestra de cDNA, en un gel de agarosa al 2 %. Los productos son específicos, amplificando el par uno de oligonucleótidos (**cpsA1**) un fragmento de 94pb y el par dos (**cpsA2**) uno de 133pb. **Derecha:** Curvas de disociación para ambos pares de oligonucleótidos obtenidas a partir del software StepOne™, en las que se muestra el cambio de fluorescencia contra cambios en la temperatura.

Anexo 2. Determinación del gen de referencia más estable para las pruebas de expresión de *cpsA*

Se evaluaron los genes *gpdA* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *actA* (gamma actina) y *tubA* (alfa tubulina) como controles endógenos, con el algoritmo normFinder (Andersen, Jensen y Ørntoft, 2004) por medio del servidor RefFinder (Xie *et al.*, 2012), disponible en el sitio <http://leonxie.esy.es/RefFinder/>. Como se muestra en la **fig. A2**, el gen *GpdA* es el que tiene la mayor estabilidad en las condiciones experimentales en las que se cuantificó la expresión de *cpsA* y por lo tanto es el gen que se usó como endógeno de referencia.

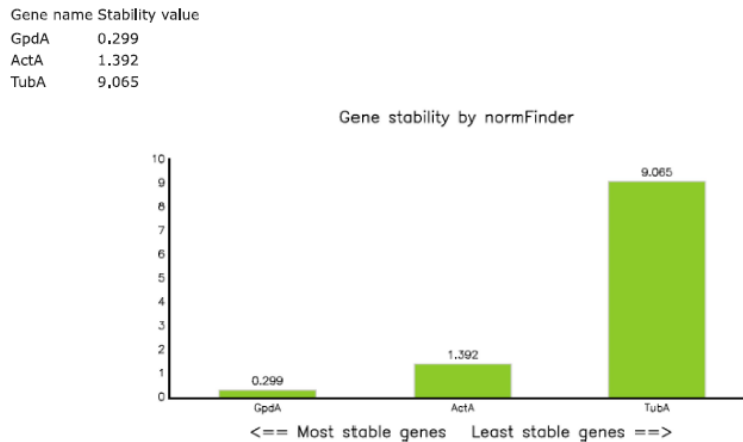


Figura A2. El gen *gpdA* muestra una expresión estable en las condiciones probadas. La gráfica muestra el valor de estabilidad para los tres genes probados (*gpdA*, *actA* y *tubA*), calculada por medio del algoritmo normFinder. Valores elevados de este parámetro indican que la expresión del gen es menos estable en las condiciones probadas (Andersen, Jensen y Ørntoft, 2004)

Anexo 3. Pruebas de especificidad de los oligonucleótidos para amplificar *brlA*

Con el fin de comprobar la especificidad de los oligonucleótidos para amplificar *brlA*, con secuencia ya publicada, se realizó el mismo procedimiento que el mencionado en el Anexo 1. Se realizaron PCR de punto final y curvas de disociación. Como se puede observar en la fig. A3, ambas pruebas indican que los oligonucleótidos diseñados son específicos para el transcrito de *brlA*.

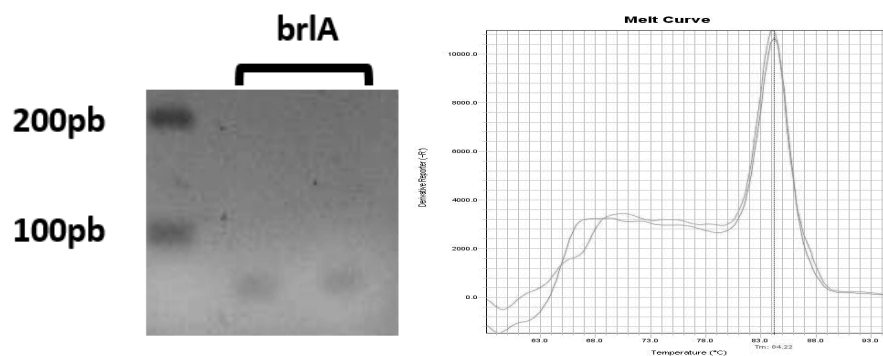


Figura A3. Los oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de *brlA* son específicos. Izquierda: Producto de PCR de punto final del transcrito de *cpsA* a partir de una muestra de cDNA, en un gel de agarosa al 2 %. Los productos son específicos, amplificando el par uno de oligonucleótidos (*cpsA1*) un fragmento de 94pb y el par dos (*cpsA2*) uno de 133pb. Derecha: Curvas de disociación para ambos pares de oligonucleótidos obtenidas a partir del software StepOne™, en las que se muestra el cambio de fluorescencia contra cambios en la temperatura.

Anexo 4. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pEM03 y alineamiento de la secuencia de los sitios de empalme de la clonación con la construcción diseñada.

Con el fin de probar que no hubiese mutaciones en el vector pEM03, se solicitaron un total de 13 secuenciaciones de éste, a la Unidad de Biología Molecular del IFC. En la **fig. A4** se muestra la cobertura de cada uno de los eventos de secuenciación en recuadros grises. Como resultado se obtuvo que no hay cambios en la secuencia del gen dentro de la construcción. En la **fig. A5** se muestran alineamientos de los sitios de empalme entre el vector parental y el inserto con las secuencias obtenidas para estas regiones. Como se puede observar, los sitios de empalme muestran la secuencia diseñada en la construcción.

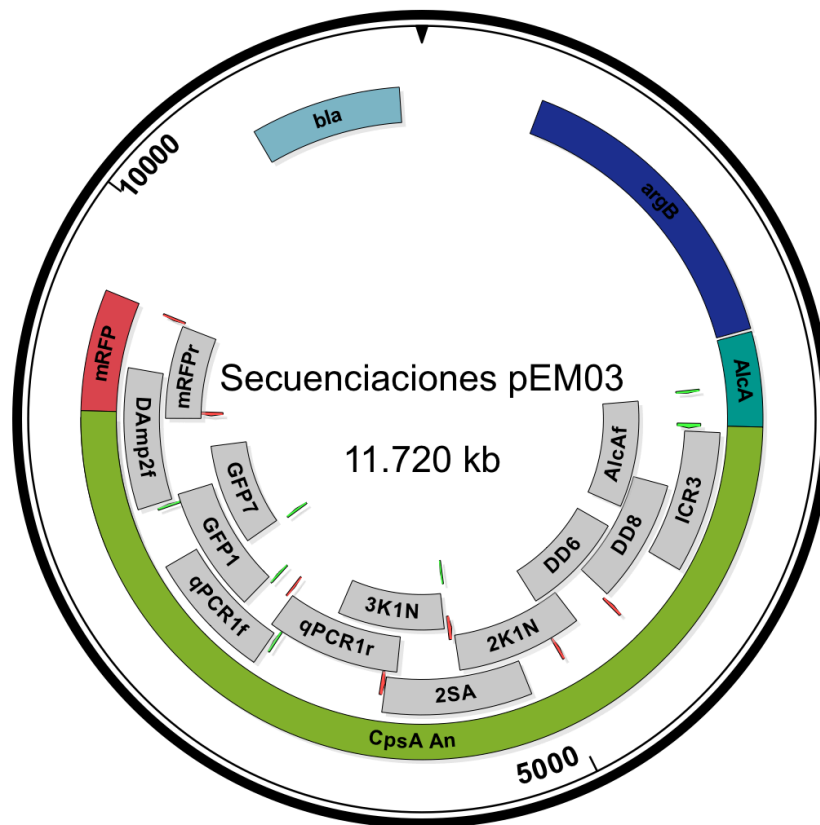


Figura A4. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pEM03. Cada uno de los rectángulos grises muestra el intervalo de secuencia que fue secuenciado utilizando el oligonucleótido cuyo nombre se indica en su interior. Se secuenció casi en su totalidad la construcción *alcA(p)::cpsA::mRFP*

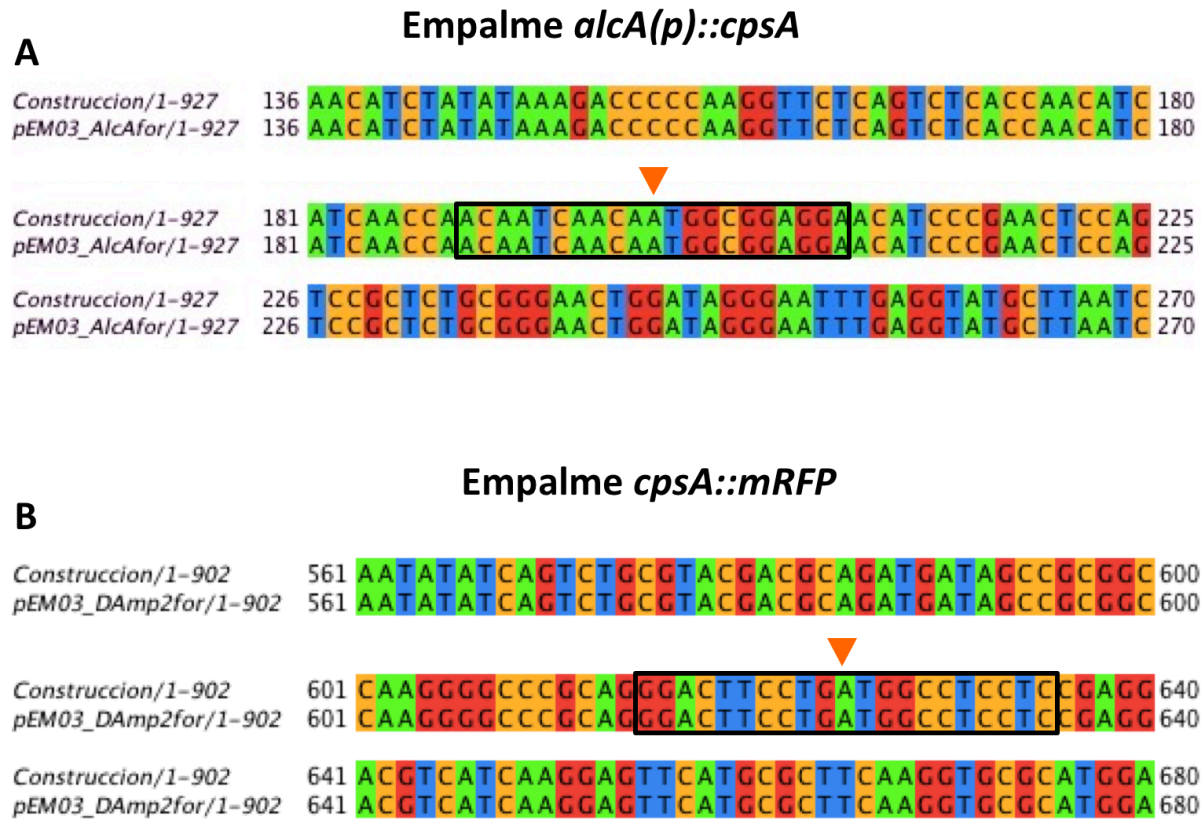


Figura A5. Los sitios de empalme entre el vector parental y el inserto tienen la secuencia esperada en el vector pEM03. (A y B) Alineamiento entre la construcción diseñada y el resultado de la secuenciación del vector pEM03, en la región de la secuencia colindante con el empalme entre *alcA(p)* del vector parental con la secuencia codificante de *cpsA* de *A. nidulans* (A) y para la región de empalme entre *cpsA* con *mRFP* (B). En cajas negras se marcan 10pb que flanquean al sitio de empalme.

Anexo 5. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pTCP1 y alineamiento de la secuencia del sitio de empalme de la región del promotor.

Con el fin de probar que no hubiese mutaciones en el vector pTCP1, se solicitaron un total de 10 secuenciaciones a la Unidad de Biología Molecular del IFC, dentro de la región de la construcción *alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP*. En la **fig. A6** se muestra la cobertura de cada uno de los eventos de secuenciación en recuadros blancos. Como resultado se obtuvo que no hay cambios en el vector respecto a la construcción diseñada. En la **fig. A7** se muestran alineamientos de los sitios de empalme entre el vector parental y el inserto con las secuencias obtenidas para estas regiones. Como se puede observar, los sitios de empalme muestran la secuencia diseñada en la construcción.

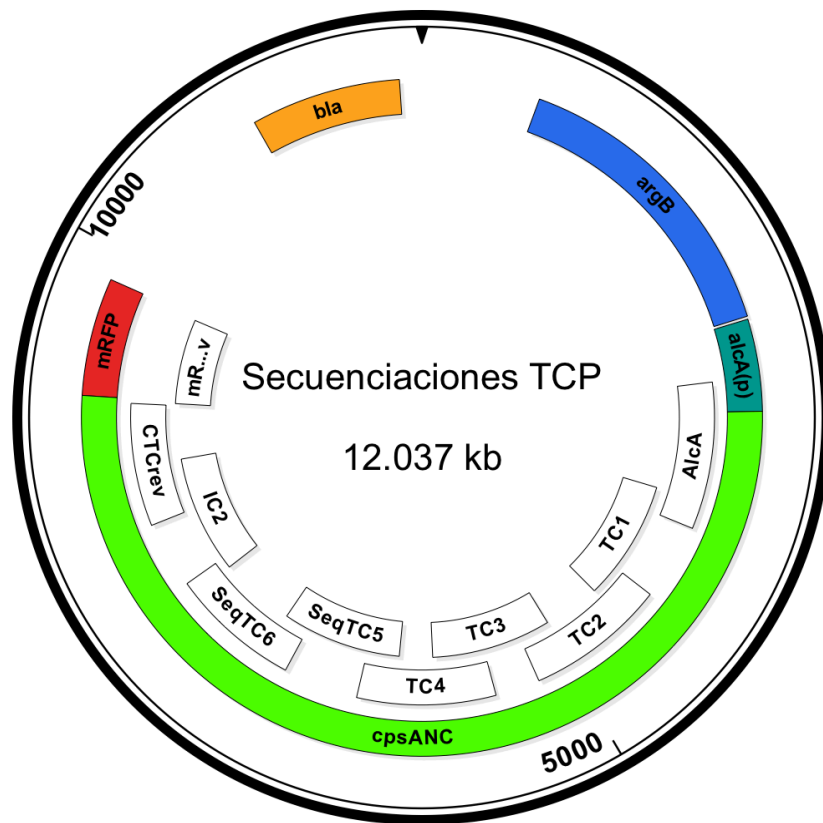


Figura A6. Cobertura de las secuenciaciones del plásmido pTCP1. Cada uno de los rectángulos blancos muestra el intervalo de secuencia que fue secuenciado utilizando el oligonucleótido cuyo nombre se indica en su interior. Se secuenció casi en su totalidad la construcción *alcA(p)::cps-1(Nc)::mRFP* (cerca del 90 %).

A**Empalme *alcA(p)::cps-1(Nc)***

Construccion/1-921	136	AACATCTATATAAAGACCCCCAAGGTTCTCAGTCTCACCAACATC	180
pTCP1_AlcAfor/1-921	136	AACATCTATATAAAGACCCCCAAGGTTCTCAGTCTCACCAACATC	180
▼			
Construccion/1-921	181	ATCAACCAA CAATCAACAGATGGCCGCGGTTAACCCCGACCTGCA	225
pTCP1_AlcAfor/1-921	181	ATCAACCAA CAATCAACAGATGGCCGCGGTTAACCCCGACCTGCA	225
▼			
Construccion/1-921	226	GGCGAAGCTGGACGAGCTACAGAGGGAGCTGGAGGTGTGTTTTGA	270
pTCP1_AlcAfor/1-921	226	GGCGAAGCTGGACGAGCTACAGAGGGAGCTGGAGGTGTGTTTTGA	270

B**Empalme *cps-1(Nc)::mRFP***

Construccion/1-670	1	GTGGAGGAGATGGGAA GATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTC	50
pTCP1_mRFPprev/1-670	1	GTGGAGGAGATGGGAA GATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTC	50
▼			
Construccion/1-670	51	ATGCGCTTCAA GGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGA	100
pTCP1_mRFPprev/1-670	51	ATGCGCTTCAA GGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGA	100

Figura A7. Los sitios de empalme entre el vector parental y el inserto tienen la secuencia esperada en el vector pc. (A y B) Alineamiento entre la construcción diseñada y el resultado de la secuenciación del vector pc, en la región de la secuencia colindante con el empalme entre *alcA(p)* del vector parental con la secuencia codificante de *cps-1* de *N. crassa* (A) y para la región de empalme entre *cps-1* con *mRFP* (B). En cajas negras se marcan 10pb que flanquean al sitio de empalme.

REFERENCIAS

- Adams, T. H., Boylan, M. T., Timberlake, W. E. (1988). *bra* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 54(3), 353–362. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90198-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90198-5)
- Adams, T. H., Wiser, J. K., Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(1), 35–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529886%5Cn>
- Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus* *brlA* developmental regulatory gene. *Molecular Microbiology*, 8(2), 211–218. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01565.x>
- Al-Saigh, R. (2017). Development of a new in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model simulating human pharmacokinetics for studying the effect of antifungal drugs and their combination against *Aspergillus* species (PhD Thesis). University of Babylon. <http://doi.org/10.13140/RG.2.2.30626.43200>
- Angoa, A. K., Aguirre, J., Ramos-Balderas, J. L. (2015). El gen *cpsA* en la diferenciación celular de *Aspergillus nidulans* (Texto no publicado) UNAM.
- Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., Aguirre, J. (2019). *Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane. *Frontiers in Microbiology*, 10(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01825>
- Chung, D., Upadhyay, S., Bomer, B., Wilkinson, H. H., Ebole, D. J., Shaw, B. D. (2015). *Neurospora crassa* ASM-1 complements the conidiation defect in a *stuA* mutant of *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, 107(2), 298–306. <https://doi.org/10.3852/14-079>
- Dalal, A., Atri, A. (2014). An Introduction to Sequence and Series. *International Journal of Research*, 1(10), 1286–1292. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42.An>
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I., Haas, H. (2003). The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: Functional analysis of two genes encoding L-ornithine N5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Molecular Microbiology*, 49(2), 359–375. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03586.x>
- Feng, X., Ramamoorthy, V., Pandit, S. S., Prieto, A., Espeso, E. A., Calvo, A. M. (2017). *cpsA* regulates mycotoxin production, morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 105(1), 1–24. <http://doi.org/10.1111/mmi.13682>
- Hill, T. W., Kafer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports*, 48(1), 20–21. <http://doi.org/10.4148/1941-4765.1173>
- Klejnstrup, M. L., Frandsen, R. J. N., Holm, D. K., Nielsen, M. T., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., Nielsen, J. B. (2012). Genetics of polyketide metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites*. <http://doi.org/10.3390/metabo2010100>
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74(1), 1–29. <http://doi.org/10.3114/sim0006>
- Larsson, C., Ali, M. A., Pandzic, T., Lindroth, A. M., He, L., Sjöblom, T. (2017). Loss of DIP2C in RKO cells stimulates changes in DNA methylation and epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 17(1), 487. <http://doi.org/10.1186/s12885-017-3472-5>
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. (2011). The social network: Deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 440–451. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2580>
- Li, J., Ping, J. L., Ma, B., Chen, Y. R., Li, L. Q. (2017). DIP2C expression in breast cancer and its clinical significance. *Pathology Research and Practice*, 213(11), 1394–1399. <http://doi.org/10.1016/j.prp.2017.09.007>
- Lu, S., Kroken, S., Lee, B.-N., Robbertse, B., Churchill, A., Yoder, O., Turgeon, G. (2003). A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. *PNAS*, 100(10), 5980–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0931375100>

- Ma, J., Zhang, L. Q., He, Z. X., He, X. X., Wang, Y. J., Jian, Y. L., ... Zhu, X. J. (2019). Autism candidate gene DIP2A regulates spine morphogenesis via acetylation of cortactin. *PLoS Biology*, 17(10), e3000461. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000461>
- Martínez, E. A. (2017). NCU00239, una proteína con dos dominios de adenilación, y su papel en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en *Neurospora crassa* (Tesis de Licenciatura). UNAM.
- Narra, H. P., Shubitz, L. F., Mandel, M. A., Trinh, H. T., Griffin, K., Buntzman, A. S., ... Orbach, M. J. (2016). A *Coccidioides posadasii* CPS1 Deletion Mutant Is Avirulent and Protects Mice from Lethal Infection. *Infection and Immunity*, 84(10), 3007–3016. <http://doi.org/10.1128/IAI.00633-16>
- Naughton, L. M., Romano, S., O’Gara, F., Dobson, A. D. W. (2017). Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* Genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>
- Nitta, Y., Yamazaki, D., Sugie, A., Hiroi, M., Tabata, T. (2017). DISCO Interacting Protein 2 regulates axonal bifurcation and guidance of *Drosophila* mushroom body neurons. *Developmental Biology*, 421(2), 233–244. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.015>
- Noblett, N., Wu, Z., Ding, Z. H., Park, S., Roenspies, T., Flibotte, S., ... Colavita, A. (2018). DIP-2 suppresses ectopic neurite sprouting and axonal regeneration in mature neurons. *The Journal of Cell Biology*, 218(1), 125–133. <http://doi.org/10.1083/jcb.201804207>
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Ouchi, N., Oshima, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Ikegami, C., Izumiya, Y., Walsh, K. (2008). Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32802–32811. <http://doi.org/10.1074/jbc.M803440200>
- Ouchi, N., Asaumi, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7127–7134. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.069468>
- Pérez, T. de J. (2017). Las reductasas férricas atípicas en el hongo *Aspergillus nidulans* y su posible función como NADPH oxidasas (Tesis de Licenciatura).
- Pöggeler, S., Nowrousian, M., Kück, U. (2006). Fruiting-Body Development in Ascomycetes. *Growth, Differentiation and Sexuality*, 325–355. http://doi.org/10.1007/3-540-28135-5_16
- Rashmi, K., Naveena, J., Sowjanya, T., Kiranmayi, P., Venugopal, M., Menon, C. P. S., Maruthi, P. (2003). *Neurospora* in full bloom. *Current Science*, 85(12), 1670–1672.
- Richards, A., Gow, N. A. R., Veses, V. (2012). Identification of vacuole defects in fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.002>
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., Canovas, D. (2011). Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 188(4), 809–822. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.130096>
- Sánchez, O., Aguirre, J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. *Fungal Genetics Newsletter*, 43(1), 48–51.
- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., ... Ostell, J. (2019). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D23–D28. <http://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- Shoji, J. Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006). Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 411–421. <https://doi.org/10.1128/EC.5.2.411-421.2006>
- Skromne, I., Sanchez, O., Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene. *Microbiology*, 141(1), 21–28.
- Soid-Raggi, G., Sánchez, O., Ramos-Balderas, J. L., Aguirre, J. (2016). The adenylate-forming enzymes AfeA and TmpB are involved in *Aspergillus nidulans* self-communication during asexual development. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00353>

- Tanaka, M., Murakami, K., Ozaki, S., Imura, Y., Tong, X. P., Watanabe, T., ... Mimori, T. (2010). DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophila*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1 - Analysis of their binding with TGF- β superfamily proteins. *FEBS Journal*, 277(20), 4278–4289. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07816.x>
- Taylor, J. W., Ellison, C. E. (2010). Mushrooms: Morphological complexity in the fungi. *PNAS*, 107(26), 11655–11656. <http://doi.org/10.1073/pnas.1006430107>
- The UniProt Consortium. (2018). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515. <http://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Timberlake, W. E., Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(5), 317. <http://doi.org/10.1007/BF00400554>
- Todd, R. B., Davis, M. A., Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature Protocols*, 2(4), 811–821. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
- Tsitsigiannis, D. I., Zarnowski, R., Keller, N. P. (2004). The Lipid Body Protein, PpoA, Coordinates Sexual and Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11344–11353. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310840200>
- Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R., Keller, N. P. (2004). Endogenous Lipogenic Regulators of Spore Balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1398–1411. <http://doi.org/10.1128/ec.3.6.1398-1411.2004>
- Walsh, C. T. (2016). Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Natural Product Reports*, 33(2), 127–135. <http://doi.org/10.1039/c5np00035a>
- Wang, Y., He, D., Chu, Y., Zuo, Y.-S., Xu, X.-W., Chen, X.-L., ... Peng, Y.-L. (2016). *MoCps1* is important for conidiation, conidial morphology and virulence in *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics*, 62(4), 861–871. <http://doi.org/10.1007/s00294-016-0593-3>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Yelton, M. M., Hamer, J. E., Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Genetics*, 81(March), 1470–1474. <http://doi.org/10.1073/pnas.81.5.1470>
- Yu, J. H., Mah, J. H., Seo, J. A. (2006). Growth and developmental control in the model and pathogenic *aspergilli*. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1577–1584. <http://doi.org/10.1128/EC.00193-06>
- Yu, J.-H. (2011). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 38(4), 229. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.4.229>