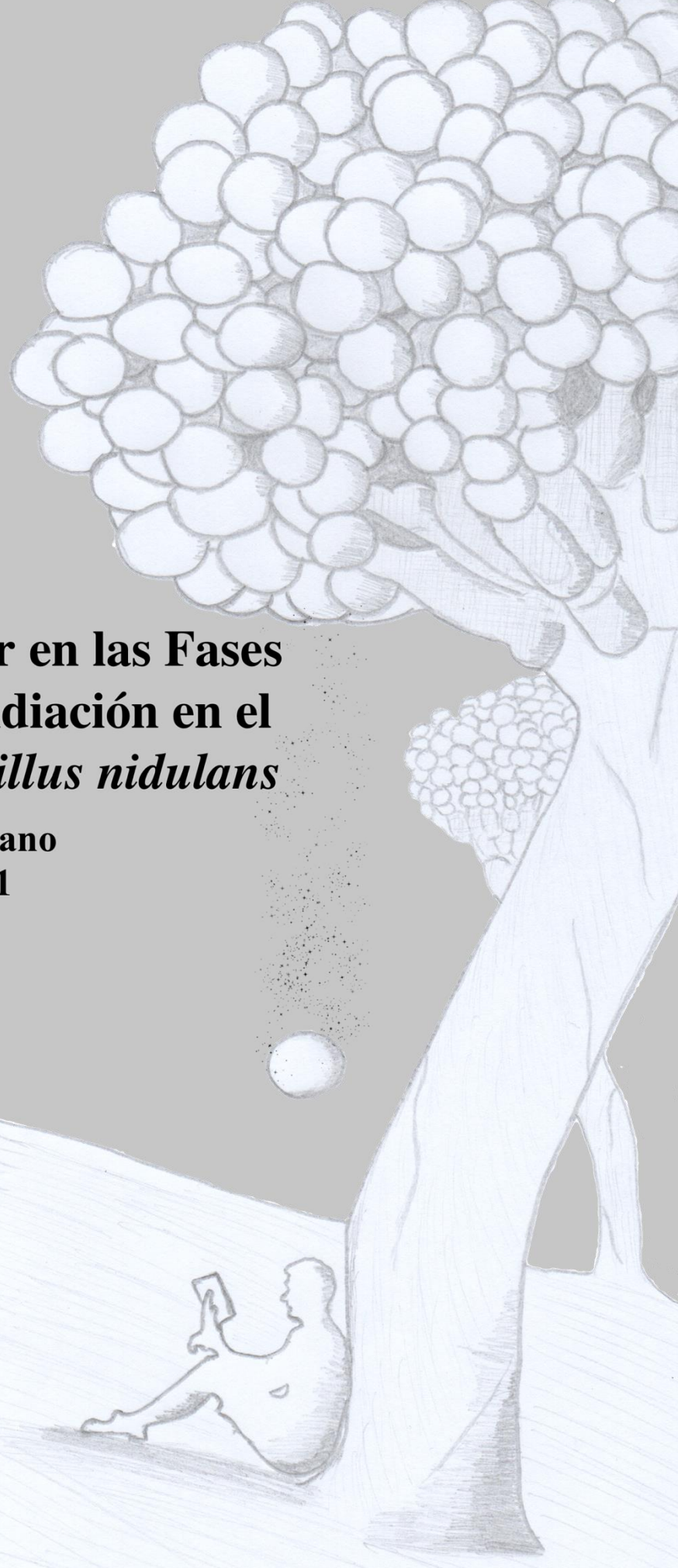




Señalización Molecular en las Fases Tempranas de la Conidiación en el Hongo Modelo *Aspergillus nidulans*

Mikel Iradi Serrano
Donostia, 2021



Biokimika II

Kimika Aplikatua

Kimika Fakultatea

Donostia



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**Señalización Molecular en las Fases Tempranas
de la Conidiación en el Hongo Modelo
*Aspergillus nidulans***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Química Aplicada y Materiales
Poliméricos por,

Mikel Iradi Serrano

2021

Director de Tesis Doctoral:

Unai Ona Ugalde

Profesor Titular

Facultad de Ciencias Químicas

EHU/UPV



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Facultad de Ciencias Químicas de Donostia (EHU/UPV) bajo la dirección del Dr. **Unai Ona Ugalde Martínez**, Profesor Titular de la UPV/EHU.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por el Gobierno Vasco a través del proyecto IT599-13, y por una beca del Programa para Formación de Personal Investigador de la UPV/EHU al doctorando **Mikel Iradi Serrano**.

“A menudo la última llave que te queda por probar abre el candado”
Anónimo

Aita, Ama, Amona, Imanol

eta Mariari

ESKERRAK / AGRADECIMIENTOS:

Gezurra dirudien arren, hauek izan dira tesi honetan idaztea gehien kostatu zaizkidan hitzak, jakin badakidalako asko izan zaretela urte hauetan zehar, hainbeste joan etorriren ondoren, nire ondoan egon zaretenak.

Lehenik eta behin, ez nuke zientziaren munduan murgiltzeko aukerarik izango, aukera eman ez bazenit. Unai, orain dela sei urte eskua luzatu zenidanetik, zuri esker hainbat erronkei aurre egiteko gai izan naiz. Ezin izango dizut nahikoa eskertu une oro nirekin izan duzun pazientzia, denbora eta hitz egiteko eskaini didazun denbora guztia. Momentu guzti hauetatik, zatitxo asko daramatzat nire baitan. Bihotzez, mila esker!

Laborategian asko izan zarete urte hauetan zehar aurrera egiten lagundu didazuenak. Oier, liburu ireki bat naiz zuretzako, beti egon zara prest izan ditudan zalantzak argitu eta momentu zailetan aurrera jarraitzeko behar nuen bultzada emateko. Marc, eskerrak ematen dizkizut niretzako ezezaguna zen mundu bat erakutsi eta tesi honetan ezinbesteko garrantzia izan duen zutabe izan zarelako.

Aunque parezca mentira, éstas han sido las palabras que más me ha costado escribir en la tesis, porque sé que habéis sido muchos los que habéis estado a mi lado durante estos años, después de tantas idas y venidas.

En primer lugar, no tendría la oportunidad de sumergirme en el mundo de la ciencia, si no me hubieras dado la oportunidad. Unai, desde que me tendiste la mano hace seis años, gracias a ti he sido capaz de afrontar varios retos. No podré agradecerte lo suficiente toda la paciencia, ayuda y el tiempo que has dedicado a estar conmigo. De todos estos momentos, me llevo muchos trocitos dentro de mí. ¡Muchas gracias, de todo corazón!

En el laboratorio habéis sido muchos los que me habéis ayudado a avanzar a lo largo de estos años. Oier, soy un libro abierto para ti, siempre has estado dispuesto a resolver las dudas que he tenido y a darme el impulso que necesitaba para seguir adelante en los momentos más difíciles. Marc, te doy las gracias por haberme mostrado un mundo desconocido para mí y haber sido un pilar fundamental en esta tesis.

Denbora azkar pasa den arren, pertsona askorekin elkarlanean aritzeko aukera izan dut laborategian, guztiegandik izan dut zer ikasia. Ane, zu izan zaitugu laborategiko gatzeta eta pipermina, barre algara galantak bota ditugu zuri esker eta egunerokotasunean aurrera jarraitzeko ezinbestekoa izan zara. Beti egon zara laguntzeko prest eta momentu zailenetan hor izan zaitut. Hitzak motz geratzen diren arren, mila esker.

Eli O. eta Eli P., momentu oso onak igaro ditugu, beti egon zarete edozertarako prest ni laguntzeko. Asko ikasi dut zuengandik, eskerrik asko bioi. Martzel eta Ainara, zer esango dizuet dagoeneko ez dakizuenik... lehenengo egunetik egon gara gogor lanean, eta nola edo hala, zailtasun gehienak batera pasa ditugula esan daiteke. Garai gogorrenetan beti luzatu didazue eskua eta behar nuen indarra eman didazue une oro. Mila esker bihotz-bihotzez guztioi!

Laborategitik kanpo ere asko izan zarete tesi honetan zuen aletxoak utzi dezutenak, eta nahiz eta ezingo zaituztedan guztiok aipatu, aldezturik, eskerrik asko guztioi. Eider, Ana, Goretti, ... zuei ere eskerrak ematen dizkizuet eskaini didazuen laguntza eta denbora guztiagatik.

Aunque el tiempo ha pasado rápido, he tenido la oportunidad de colaborar con muchas personas en el laboratorio, de las cuales he aprendido mucho. Ane, tú has sido la alegría de la huerta, nos hemos reído a carcajadas y has sido imprescindible para seguir adelante en el día a día. Siempre has estado presente en los momentos más difíciles, dispuesta a ayudar en lo que hiciera falta. Aunque las palabras se queden cortas, muchas gracias.

Eli O. y Eli P., hemos pasado muy buenos momentos, siempre dispuestas a ayudarme. He aprendido mucho de vosotras, gracias a los dos. Martzel y Ainara, qué os voy decir que no sepáis ya... hemos trabajado al pie del cañón desde el primer día, se puede decir que hemos pasado la mayor parte de las dificultades juntos. Siempre me habéis tendido la mano para darme la fuerza que necesitaba. ¡Gracias a todos, de todo corazón!

Fuera del laboratorio también habéis sido muchos los que habéis dejado vuestro granito de arena en esta tesis, y aunque no podré mencionaros a todos, de antemano, gracias a todos. Eider, Ana, Goretti, ... también os agradezco a vosotros la ayuda y el tiempo que me habéis prestado.

Bestalde, nahiz eta hitz hauek oso motz geratuko diren adierazi nahi dudan guztia esateko, alde batetik eskerrak eman nahi dizkiet kuadrillako eta ekipoko kide guztiei. Bestalde, behar izan dudan guztietan beti nire ondoan izan zaituztedalako, aita, ama, amona, Imanol... bihotz-bihotzetik eskerrak eman nahi dizkizuet, ezin bait da zuek baino altxor handiagorik izan.

Edo agian bai... Maria, ezin atal hau amaitu zuri eskerrak eman gabe. Beti izan zaitut nire ondoan egun gazi eta gozoetan, eta nola edo ala beti konpondu zara irribarre bat margotzeko nigan. Mila esker txiki, bihotz-bihotzez.

Por otra parte, aunque estas palabras no hacen justicia a todo lo que quiero decir, quiero dar las gracias a todos y cada uno de la cuadrilla y el equipo. De la misma forma, porque siempre que lo he necesitado os he tenido a mi lado, aita, ama, amona, Imanol... gracias de todo corazón, no se puede tener mayor tesoro que a vosotros.

O tal vez sí... María, no puedo terminar este apartado sin darte las gracias. Siempre te he tenido a mi lado, en los mejores y peores días, y de alguna forma te las has arreglado para dibujar una sonrisa en mí. Txiki, gracias de todo corazón.

ABREVIATURAS

3'-UTR	3' untranslated region o región 3' no traducida
5'-UTR	5' untranslated region o region 5' no traducida
5-FOA	5-Fluoroorotic acid o 5-Ácido fluoroorótico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Af	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain o dominio de cremallera de leucina
CDP	Central Developmental Pathway o ruta central de desarrollo
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1]decan}-4-yl)phenyl phosphate
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid o ácido etilendiaminotetraacético
Flb	Fluffy, low bristle expression o aconidial con baja expresión de <i>brlA</i>
GFP	Green Fluorescent protein o proteína fluorescente verde
GFP1	Green fluorescence primer 1
GFP2	Green fluorescence primer 2
GFP	Green fluorescent protein o proteína fluorescente verde
GLB	Gel Loading Buffer o Tampón de carga de gel
GSP1	Gene specific primer 1
GSP2	Gene specific primer 2
GSP3	Gene specific primer 3
GSP4	Gene specific primer 4
HA	Residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
Kb	kilobase
kDa	Kilodalton (= 1000 Da)

LB	Luria-Bertani
MCA	<i>Aspergillus</i> complete medium o medio completo <i>Aspergillus</i>
mCh	Monomeric CherryRed Fluorescent Protein o proteína fluorescente monomérica roja CherryRed
MMA	<i>Aspergillus</i> minimal medium o medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMR	<i>Aspergillus</i> regeneration medium o medio mínimo de regeneración
MMR-TOP	<i>Aspergillus</i> regeneration medium-TOP o medio mínimo de regeneración-TOP
mRFP	Monomeric Red fluorescent protein o proteína monomérica fluorescente roja
NLS	Nuclear localization signal o señal de localización nuclear
NES	Nuclear export signal o señal de exportación nuclear
PABA	Para-aminobenzoic acid o ácido para-aminobenzoico
PCR	Polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PP1	Promoter primer 1
PP2	Promoter primer 2
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate o dodecil sulfato de sodio
SMP1	Selectable marker primer 1
TCA	Trichloroacetic acid o ácido tricloroacético
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane o tris (hidroximetil)-aminometano
UDA	Upstream developmental activators o activadores tempranos del desarrollo
UV	Ultravioleta
WMM	Watch minimal medium o medio mínimo para microscopía de fluorescencia
WT	Wild type o silvestre

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1. Características generales de <i>Aspergillus nidulans</i>	7
2. Ciclo de vida	7
2.1. Crecimiento vegetativo	9
2.2. Desarrollo asexual	10
3. La transición desde la hifa al conidióforo en <i>Aspergillus nidulans</i>	11
4. El Factor FluG y sus funciones en la formación del conidióforo	15
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	23
2. Oligonucleótidos	25
3. Plásmidos	29
3.1. Plásmidos utilizados en <i>A. nidulans</i>	29
3.2. Plásmidos utilizados para expresión en <i>E. coli</i>	30
4. Medios y condiciones de cultivo de <i>Aspergillus nidulans</i>	31
5. Recuento de conidias y cleistotecios y pesaje de colonias	33
5.1. Recuento de conidias	33
5.2. Recuento de cleistotecios	33
5.3. Pesaje de colonias	34
6. Experimentos de contacto entre colonias	34
7. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	34
7.1. Obtención de protoplastos	35
7.2. Transformación de protoplastos	36
8. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos	37
8.1. Generación de mutantes nulos y etiquetado de genes con o sin promotor inducible	37
8.2. Extracción de ADN genómico	40
8.3. <i>Southern Blot</i>	41
8.4. Mutagénesis dirigida	44
8.5. Inducción de la expresión	45
8.6. Sustitución de las regiones de <i>fluG</i> por homólogos bacterianos y de planta	45

9. Técnicas de análisis de expresión génica	47
9.1. Extracción y cuantificación del ARN total	47
9.2. Síntesis de cDNA.....	47
9.3. Real-Time PCR (PCR a tiempo real).....	47
10. Técnicas de biología molecular para <i>Escherichia coli</i>	48
10.1. Medios de cultivo y condiciones para <i>E. coli</i>	48
10.2. Transformación de <i>E. coli</i>	48
10.3. Extracción de ADN plasmídico	49
10.4. Digestión y ligación de plásmidos y fragmentos de ADN	50
11. Técnicas de biología molecular para <i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	51
11.1. Medios de cultivo y condiciones para <i>L. paracasei</i> y <i>P. aeruginosa</i>	51
11.2. Extracción de ADN genómico en bacteria	52
12. Aislamiento y manipulación de proteínas en <i>Aspergillus nidulans</i>	53
12.1. Extracción de proteínas.....	53
12.2. <i>Western blot</i>	54
13. Herramientas de análisis bioinformático	55
13.1. Construcción y secuenciación.....	55
13.2. Análisis <i>in silico</i> de FluG	55
13.3. Búsqueda de homólogos de FluG en bacterias y plantas.....	55
13.4. Búsqueda de estructuras de cristal mediante SWISS-MODEL.....	56
13.5. Modelado de FluG mediante MAESTRO	56
14. Microscopía de fluorescencia.....	57
 CAPÍTULO III: PRIMERA APROXIMACIÓN A LA FUNCIÓN DE <i>FLUG</i>	 59
1. Introducción	61
2. Resultados	63
2.1. La producción de conidias no se ve afectada en una cepa mutante Δ <i>ausA</i> .	63
2.2. Una cepa Δ <i>ausA</i> revierte el fenotipo aconidial de un mutante <i>cfwA2</i> y Δ <i>fluG</i>	63
2.3. La delección del gen <i>fluG</i> afecta tanto al desarrollo asexual, como al sexual en <i>Aspergillus nidulans</i>	65

2.4. FluG presenta una distribución homogénea en el citoplasma.....	66
3. Discusión.....	70

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE SECUENCIA Y PREDICCIÓN FUNCIONAL DE FLUG73

1. Introducción.....	75
2. Resultados.....	78
2.1. Primera Etapa. FluG contiene dos regiones afines a sendos dominios enzimáticos.....	78
2.2. Estudio bioinformático de la región N-terminal.....	79
2.3. Estudio bioinformático de la región C-terminal.....	88
2.4. Estudio comparativo de FluG con las γ -glutamil poliamina ligasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
2.5. Los genes homólogos a las dos regiones de FluG están presentes en bacterias, hongos y plantas.....	97
2.6. Las dos regiones de FluG están presentes en operones de bacterias.....	100
3. Discusión.....	101

CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE FLUG... 107

1. Introducción.....	109
2. Resultados.....	110
2.1. Las regiones N- y C-terminal de FluG cumplen distintas funciones.....	110
2.2. La expresión por separado de las regiones N- y C-terminal de FluG afecta al desarrollo sexual.....	112
2.3. La sustitución de los residuos conservados afecta a la función de FluG...	113
2.4. Niveles de expresión del gen <i>fluG</i> en distintos mutantes.....	114
2.5. La sustitución heteróloga de ambas regiones de FluG por sus homólogos bacterianos complementan su función.....	115
2.6. La sustitución heteróloga de FluG por su homólogo de planta, NodGS, no complementa su función.....	117
2.7. Precisiones sobre la actividad enzimática de la región C-terminal.....	118
3. Discusión.....	126

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL.....	131
Una enzima bifuncional	133
La función de FluG en el contexto del micelio	137
El papel de FluG más allá de su relación como UDA.....	141
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS	169
Anexo 1	171
Anexo 2	172
Anexo 3	173
Anexo 4	175
Anexo 5	176
Anexo 6	177
Anexo 7	180
Anexo 8	181
Anexo 9	183
Anexo 10	184
Anexo 11	185
Anexo 12	186
Anexo 13	187
Anexo 14	188
Anexo 15	191
Anexo 16	192
Anexo 17	193
Anexo 18	194
Anexo 19	195
Anexo 20	196
Anexo 21: Artículo científico	197

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Características generales de *Aspergillus nidulans*

El género *Aspergillus* (Geiser et al., 2007) comprende unas 300 especies, entre las que se incluyen algunas de interés alimentario (*A. niger* y *A. oryzae*) y clínico (*A. fumigatus*, *A. flavus* o *A. parasiticus*) (Taylor et al., 1993). *Aspergillus nidulans* es un organismo modelo empleado en estudios de biología fundamental (Pontecorvo et al., 1953; Martinelli, 1994). Sus características para el cultivo (37 °C), carácter saprófito, la facilidad para realizar experimentos en genética clásica, el carácter haplo-diplonte del ciclo de vida y el carácter no patógeno de esta especie facilitan su uso (Taylor et al., 1993).

El genoma de *A. nidulans*, de 30,52 millones de pares de bases, está distribuido en 8 cromosomas. Contiene alrededor de 11.000 genes (Galagan, 2005), de los cuales, solo el 20% han sido caracterizados (Andersen, 2014). Los datos actualizados del genoma pueden consultarse en *Aspergillus Genome Database* (www.aspg.com) (Cerqueira et al., 2014), sin embargo, la información más completa está siendo integrada en la base de datos FungiDB (www.fungidb.org/fungidb/) (Basenko et al., 2018).

2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* incluye fases haplontes y diplontes, detallados en la Figura 1 (Casselton y Zolan, 2002). La primera etapa (haploide) comienza con la germinación de una espora y continúa con la formación de un tubo germinativo. El crecimiento vegetativo, está basado en hifas, que conforman una colonia intercomunicada denominada micelio. Dependiendo de los estímulos del entorno, el hongo puede llevar a cabo el desarrollo asexual para formar conidias (mitosporas), o sexual, dando lugar a ascosporas (meiosporas). En ciertos casos, un individuo puede llevar a cabo la fusión de hifas con otro, con fusión de núcleos, dando lugar a un diploide (ciclo parasexual). Teniendo en cuenta que esta tesis se ha centrado principalmente en las etapas comprendidas entre el crecimiento vegetativo y el desarrollo asexual, a continuación, se explicarán detalle estas dos fases del ciclo de vida.

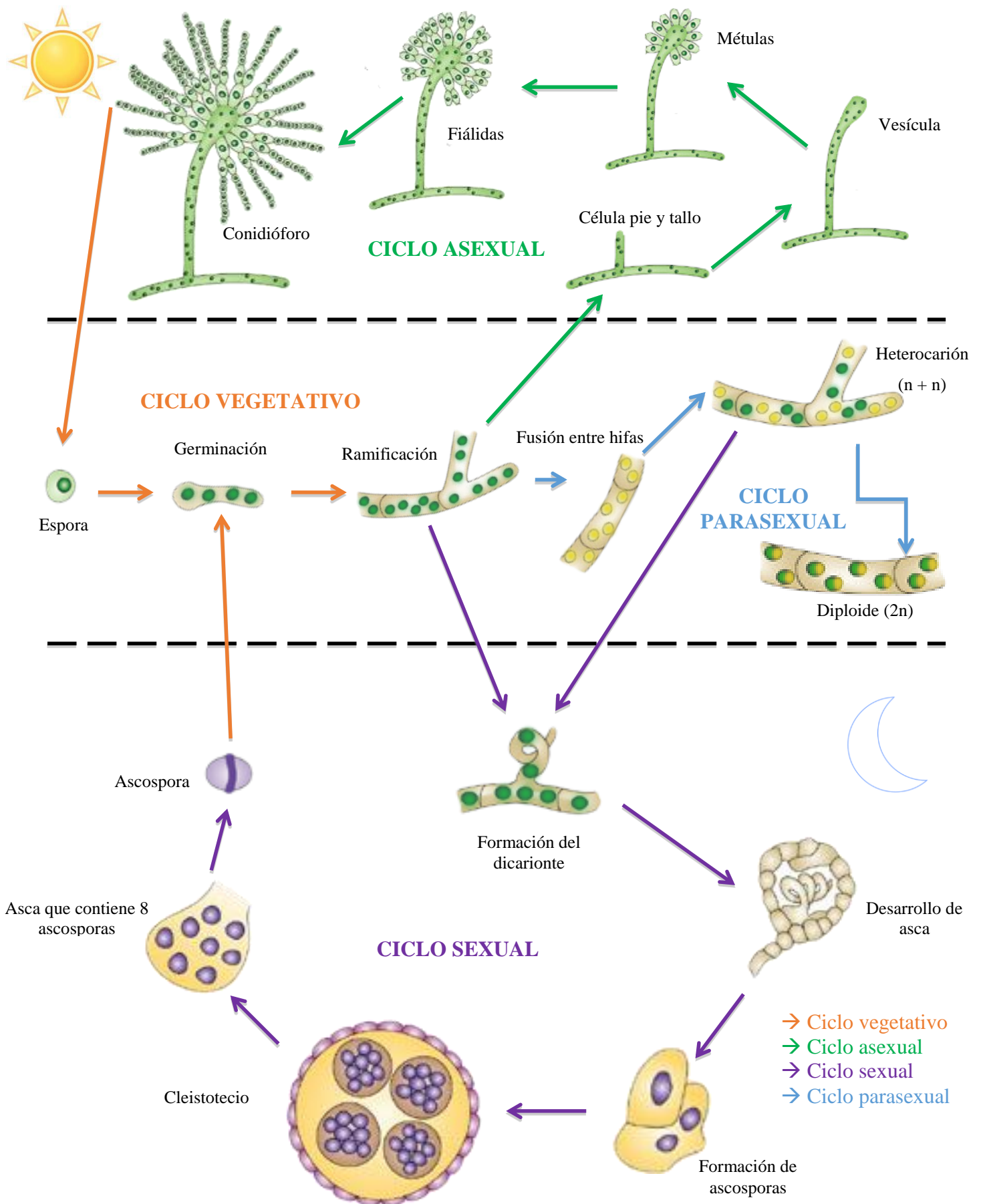


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Modificado a partir de (Casselton y Zolan, 2002)

2.1. Crecimiento vegetativo

La formación del micelio se inicia con la germinación una espora asexual o sexual. Estímulos externos (principalmente, presencia de agua y azúcares) propician una primera fase de crecimiento isotrópico (Momany, 2002). A continuación, se establece un punto de crecimiento polarizado dando lugar al tubo germinativo. Este tubo se extiende de manera polarizada hasta dar lugar a la formación de una hifa. Las hifas son células cilíndricas multinucleadas que mantienen un crecimiento polar (Riquelme et al., 2003) y están separadas por septos, a través de cuyos poros se regula el flujo de material celular (Harris, 2001).

La hifa principal da lugar a ramificaciones, las cuales se van extendiendo sin alterar al crecimiento de la hifa principal (Trinci, 1970). A medida que transcurre este patrón de crecimiento, las ramificaciones distales acaban fusionándose entre sí mediante un proceso denominado anastomosis, el cual ha sido observado detalladamente en el ascomiceto *Neurospora crassa* que ofrece ventajas para la observación microscópica, por su tamaño (Roper et al., 2015; Fischer y Glass, 2019) (Figura 2). La cinética del crecimiento de un micelio ha sido estudiada en detalle en *Aspergillus nidulans* (Trinci, 1969; 1970).

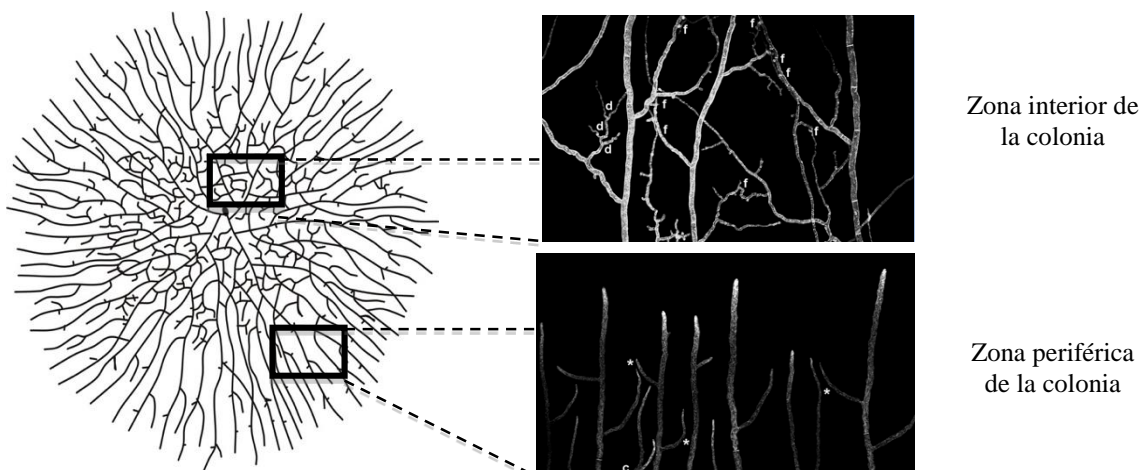


Figura 2. Morfología de una colonia de *Neurospora crassa* durante el ciclo vegetativo: En la zona interior de la colonia, las hifas están interconectadas tras fenómenos de anastomosis (arriba a la derecha), mientras que, en la zona periférica, se repelen la una a la otra (abajo a la derecha). Modificado a partir de (Hickey et al., 2002) y (Buller, 1933)

2.2. Desarrollo asexual

Las hifas vegetativas son células totipotentes, capaces de adoptar los distintos programas de desarrollo (Figura 1). En el caso del desarrollo asexual, ciertas células del micelio inician el proceso de desarrollo que culmina en la formación del conidióforo. El proceso se inicia con la formación de la célula pie (Mims et al., 1988). A partir de esta célula, se genera un tallo que se extiende de manera perpendicular al sustrato hasta alcanzar aproximadamente 100 μ m (Figura 3A). A continuación, la zona apical del tallo se expande formando la vesícula (Figura 3B). Una vez formada la vesícula, emergen primero las métulas (Figura 3C) y sobre estas, las fiálidas, células especializadas en la producción de conidias (Figura 3D). Finalmente, se forman las conidias de manera acropetal (Figura 3E) (Adams et al., 1998).

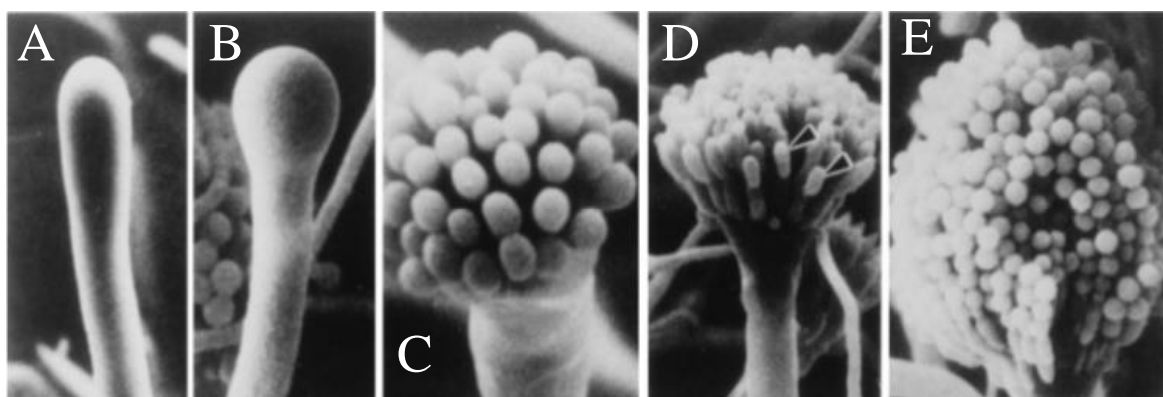


Figura 3. Cambios morfológicos de la hifa. El tallo (A), la vesícula (B), las métulas (C), las fiálidas (D) y las conidias (E). Modificado a partir de (Adams et al., 1998).

Las colonias presentan hifas no diferenciadas en su margen, las cuales solo presentan crecimiento vegetativo (Figura 4). La exposición de las hifas competentes en condiciones idóneas para la formación de conidióforos, resulta en el inicio del programa de desarrollo asexual.

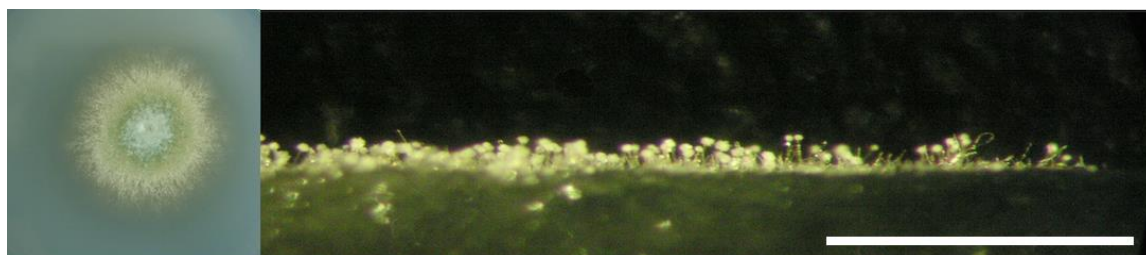


Figura 4. Imagen representando la emergencia de conidióforos desde la periferia de la colonia (derecha) hacia la zona interior de la colonia (izquierda). Barra de escala = 5 mm.

3. La transición desde la hifa al conidióforo en *Aspergillus nidulans*

Este estudio se ha centrado principalmente en el inicio del desarrollo asexual del hongo, en el que las hifas vegetativas competentes responden estímulos del entorno que conducen a su diferenciación llevando a cabo los cambios morfogénéticos ya descritos. Estudios genéticos determinaron que algunos genes que se expresan en células vegetativas son necesarios para la inducción del desarrollo asexual, como se explicará a continuación.

Las células que conforman el micelio deben adquirir la madurez o competencia necesaria para dar paso a la formación de conidióforos. Axelrod et al. (1973) observaron que una colonia de *A. nidulans* necesita un mínimo de 20 horas de crecimiento para adquirir la competencia para promover el desarrollo asexual. Una vez obtenida la competencia, el período requerido para la producción de un conidióforo es de aproximadamente 5 horas (Noble y Andrianopoulos, 2013).

El inicio del desarrollo asexual requiere de ciertos estímulos ambientales. El estímulo principal para inducir el desarrollo es la emergencia al aire (Morton, 1961).

En el caso de *Aspergillus nidulans* la exposición a la luz roja (645-700 nm) y azul (400-495 nm) y concentraciones bajas de CO₂ son factores ambientales que favorecen formación de conidióforos sobre el desarrollo sexual (Mooney y Yager, 1990). La detección de luz se efectúa por una serie de fotoreceptores sensibles a la luz roja (fitocromo) (Blumenstein et al., 2005) y la luz azul ('white collar') (Purschwitz et al., 2008). La detección y transducción de estas señales implica a un complejo de factores colectivamente denominado como complejo Velvet (Bayram et al., 2010). Dentro de este complejo, uno de los reguladores que destaca en respuesta a la luz es VeA, una proteína con un papel importante en la señalización de este estímulo (Calvo, 2008). VeA regula multitud de procesos como la transducción de las condiciones lumínicas percibidas por los fotoreceptores (Stinnett et al., 2007; Bayram et al., 2008; Purschwitz et al., 2009), el desarrollo asexual y sexual (Kim et al., 2002), la regulación de metabolitos secundarios (Kato et al., 2003), y la respuesta al estrés nutricional (Atoui et al., 2010).

Existen factores endógenos que modulan el equilibrio entre el desarrollo asexual y sexual. Estos compuestos son conocidos como 'psi factors' (**p**recocious **s**exual **i**nducers), pertenecen a la familia de las oxilipinas (Tsitsigiannis et al., 2005). De la misma forma,

las poliaminas, afectan también a la producción de conidias y a la maduración de las células de la colonia (Guzmán-de-Peña et al., 1998; Rocha y Wilson, 2019).

Al margen de estos estímulos endógenos, ciertas condiciones que comprometen el crecimiento de la colonia, genéricamente englobadas como de estrés, propician el desarrollo asexual. Los tipos de estrés mejor estudiados son el osmótico, el oxidativo y el estrés producido por hambre de carbono o nitrógeno (Etxebeste et al., 2010b). El estrés osmótico es inducido por concentraciones elevadas de sales inorgánicas en el medio de cultivo (Lee y Adams, 1996), mientras que el estrés oxidativo está condicionado por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vargas-Perez et al., 2007). En lo que respecta al estrés inducido por la falta de nutrientes, se ha podido confirmar que la ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno es capaz de inducir la conidiación, incluso en un medio sumergido, donde no tiene lugar el contacto con la atmósfera (Skromne et al., 1995). En general, se entiende que, en condiciones de estrés, la inducción del desarrollo asexual está regido por circuitos de regulación distintos a los que operan en condiciones de crecimiento normales.

Frente a estos estímulos, el hongo cuenta con varios factores genéticos, los cuales, actúan tanto en la regulación del cese del crecimiento, como la inducción de la formación del conidióforo. En lo que respecta a la regulación del crecimiento, *A. nidulans* cuenta con un sistema formado por proteínas G heterotriméricas (Lafon et al., 2005), y otras proteínas que regulan la señalización de la proteína G, controlando, la intensidad y la duración de la señal de la proteína G (Yu, 2006; El-Defrawy y Hesham, 2020).

Los genes que participan en la inducción del desarrollo asexual están clasificados según la etapa del desarrollo en la que actúan. El primer grupo recoge aquellos factores que se expresan en hifas vegetativas y se conocen como factores de inducción temprana, o UDAs (**U**pstream **D**evelopmental **A**ctivators) (Yu et al., 2006). Dentro de este grupo, se han descrito un total de 6 genes: *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (Wieser et al., 1994) (Figura 5). Las funciones que se han atribuido a los UDAs son la inhibición del crecimiento vegetativo y la regulación del inicio del desarrollo del conidióforo hasta el estadio de la formación de la vesícula. En estudios de epistasis, FluG (**fluffy**) y FlbA (*fluffy low brlA*) han sido descritos como los primeros factores de inducción temprana (Lee y Adams, 1996), y que el resto (*flbB*, *flbE*, *flbC* y *flbD*) (*fluffy low brlA*) le suceden en la función (Ni et al., 2010). A *flbA* se le ha atribuido un papel de regulador de la

señalización de la proteína G (Yu et al., 1996), la cual actúa en la traducción de señales que regulan el crecimiento de la colonia (Li et al., 2007). FlbA y FluG muestran una dependencia mutua en la inducción del desarrollo asexual, ya que la presencia de ambos es necesaria para que se inicie la formación del conidióforo (Lee y Adams, 1996). Sin embargo, el papel de FluG en el proceso no se ha esclarecido, como se detallará posteriormente.

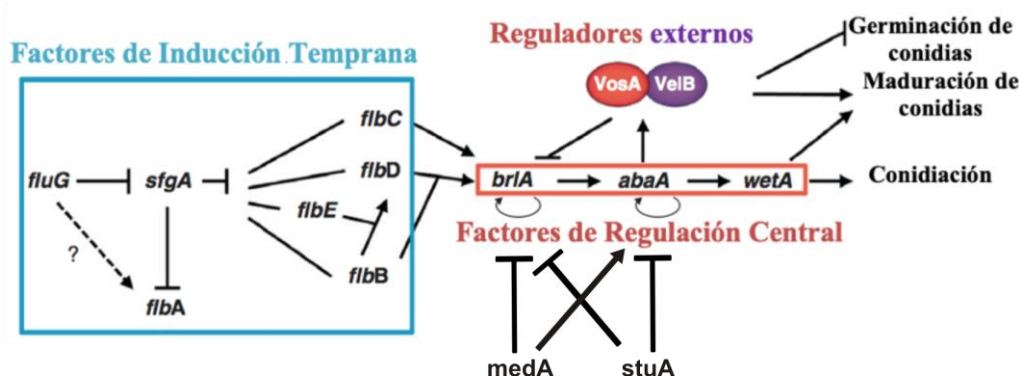


Figura 5. Rutas genéticas de la conidiación. Estímulos tanto externos como endógenos activan los Factores de Inducción Temprana (UDA), cuyo papel se centra en la activación de la Ruta Central del Desarrollo (CDP), la reguladora de la síntesis del conidióforo. Modificada a partir de (Park y Yu, 2012). Dentro de la ruta UDA, se ha propuesto que FluG actúa sobre FlbA y SfgA, eliminando el efecto represor que tiene este último en la inhibición de los genes Flb, los cuales, son los encargados de regular la inducción del gen *brlA*. Una vez inducido el gen *brlA*, le siguen la activación de los genes *abaA*, *wetA*, *medA* y *stuA*, encargados de llevar a cabo varios procesos que completan la formación de la estructura del conidióforo y la formación de las esporas. Modificada a partir de (Park y Yu, 2012).

Se ha planteado que *flbB*, *flbD* y *flbE* actúan conjuntamente y que *flbC* juega un papel paralelamente a estos últimos (Yu et al., 2006). *flbB* codifica un factor de transcripción tipo bZip, que está localizado en la punta de las hifas (Spitzenkörper) y en el núcleo más apical de las hifas vegetativas (Etxebeste et al., 2009). *flbD* codifica un factor de transcripción tipo cMyb que está localizado en el núcleo de las hifas vegetativas (Garzia et al., 2010) y *flbE* codifica una proteína que contiene dominios funcionales conservados (Cortese et al., 2011) y es necesaria para la localización de *flbB* en el Spitzenkörper (Garzia et al., 2009). *flbC*, codifica un factor de transcripción C₂H₂ que se encuentra en el núcleo de las hifas vegetativas y las estructuras que forman el conidióforo (Kwon et al., 2010).

Existen genes que, sin estar catalogados en el grupo de los UDAs, son necesarios para iniciar el desarrollo asexual, puesto que sus mutantes afuncionales, son aconidiales, sin alteraciones notables en el crecimiento. Como ejemplo, *atgA* (*atg1*) (Krohn et al.,

2014), *atgH* (*atg8*) (Kikuma et al., 2006; Pinar et al., 2013), *atg4*, *atg13*, *atg15* (Kikuma y Kitamoto, 2011), *atg26* (Kikuma et al., 2017) asociados a la autofagia, *gmcA* (Etxebeste et al., 2012) y otros enumerados por (Martinelli y Clutterbuck, 1971) los cuales no se han asociado con procesos celulares específicos. El desarrollo del conidióforo conlleva cambios profundos en el metabolismo de la colonia, junto con un incremento en la producción de metabolitos secundarios y la activación de un proceso autolítico y de reciclado de nutrientes mediante la autofagia (Anderson y Smith, 1971; Kikuma et al., 2007; Shoji et al., 2010) (Figura 6).

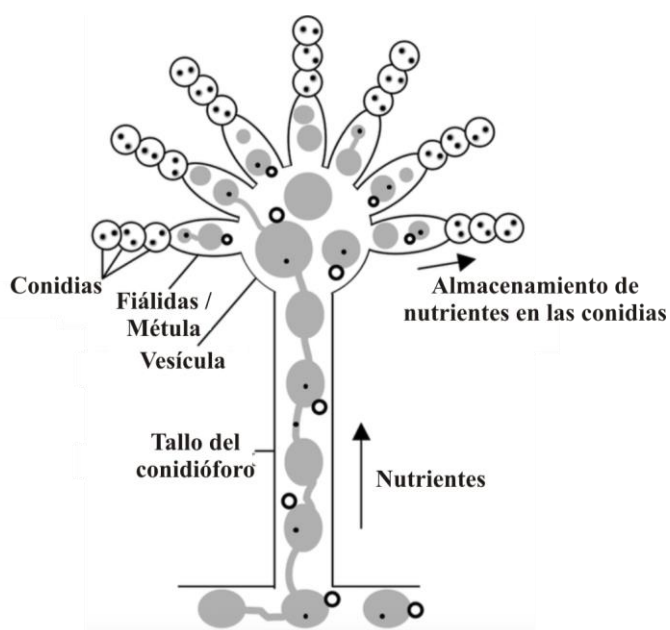


Figura 6. Diagrama esquemático del flujo de nutrientes reciclados por autofagia en conidiación. Los nutrientes reciclados por la autofagia se transportan a través de vacuolas esféricas y tubulares y se almacenan en conidias. La autofagia también contribuye a la diferenciación en vesículas de conidióforos, fiálidas/métulas y conidias. Las vacuolas esféricas y tubulares se muestran en color gris, y los nutrientes están indicados mediante puntos negros. Las flechas indican el flujo de nutrientes. Las vacuolas en las que ocurre la autofagia se indican con aros negros. Modificado a partir de (Kikuma et al., 2007)

El segundo grupo de factores son necesarios para culminar en desarrollo del conidióforo. Estos factores componen la ruta central del desarrollo, o CDP (**C**entral **D**evelopmental **P**athway) (Adams et al., 1988) (Figura 5), la cual está gobernada por los genes *brlA* (**b**ristle), *abaA* (**a**bacus) y *wetA* (**w**et white). El primer gen que corresponde esta ruta es *brlA*, el cual se expresa exclusivamente en el conidióforo (Adams et al., 1998) y controla la expresión de genes *abaA* y *wetA*, cuyos papeles se centran en la regulación de la diferenciación de la fiálidas (Sewall et al., 1990a) y la producción de pigmentación (Sewall et al., 1990b), respectivamente. Cabe destacar la existencia de otros factores como *medA* (**m**edusa) y *stuA* (**s**tunted) (Miller et al., 1992; Miller et al., 1993) los cuales

tienen un papel importante en la regulación de los factores *brlA* y *abaA* y la formación de las métulas y fiálidas, respectivamente. Finalmente, existe otro factor de transcripción llamado *vosA* (viability of spores), necesario para llevar a cabo la maduración de las esporas (Kim et al., 2020).

4. El Factor FluG y sus funciones en la formación del conidióforo

Tal y como se ha explicado en los apartados anteriores, el desarrollo asexual en *Aspergillus nidulans*, está coordinado por un complejo mecanismo, del cual desconocemos en qué procesos bioquímicos actúan los genes que lo regulan (Miller, 1990). En este marco, esta tesis se ha centrado en esclarecer el papel que cumple FluG, factor que ha recibido poca atención desde su primera descripción hace casi dos décadas.

La ausencia del gen *fluG* produce un defecto por el que no se induce el desarrollo asexual en condiciones normales (ausencia de estrés) dando como resultado a una colonia formada por un cúmulo de hifas vegetativas aéreas no diferenciadas. Este fenotipo está catalogado como ‘*fluffy*’ (peludo), el cual se observa también en todos los mutantes de los genes UDA (Adams et al., 1998). Se ha observado que FluG está localizado mayormente en el citoplasma (Lee y Adams, 1994).

A nivel de secuencia, FluG guarda una estrecha similitud con una amidohidrolasa (Rexer et al., 2006) en una parte de la secuencia y una con una glutamina sintetasa tipo I (GSI) (Lee y Adams, 1994) en otra parte de la secuencia, ambas de origen procariota. No obstante, ensayos enzimáticos confirmaron que FluG no codifica una actividad GS. Junto con esta evidencia, se confirmó también que la GS de la cianobacteria *Anabaena sp.* no era capaz de revertir el fenotipo aconidial de una cepa nula en el gen *fluG*. El gen *fluG*, no era capaz de complementar la ausencia de la GS nativa en *Anabaena sp.* (Margelis et al., 2001). Si bien se desconoce la función de FluG, se comprobó que la región comprendida entre los aminoácidos 385 y 869 era suficiente para inducir el desarrollo asexual (D'Souza et al., 2001). FluG es necesario para revertir el efecto represor del factor de transcripción SfgA (Suppressor of FluG) el cual inhibe la expresión de varios genes UDA (Seo et al., 2003).

FluG es necesario para la producción de un metabolito que se acumula en las hifas aéreas y se difunde en el medio de crecimiento (Lee y Adams, 1994). Este metabolito no

identificado pudo causar la esporulación de un mutante nulo (*AfluG*) en la zona de contacto entre ambas colonias, incluso cuando estaban separadas por una membrana de tamaño de poro de 6-8 kDa (Lee y Adams, 1994). Otros estudios reportaron que un mutante nulo de FluG no producía un aducto de dos metabolitos secundarios llamados dehidroaustinol y diorcinol, que, era capaz de inducir la esporulación de un mutante nulo en *fluG* (Rodríguez-Urra et al., 2012). Se ha puesto en duda que el citado aducto fuese el factor de FluG, puesto que una cepa que no produce dehidroaustinol, es capaz de esporular (Nielsen et al., 2011). Otros estudios han verificado que mutantes de los genes UDA que están río debajo de FluG (FlbB y FlbE) pueden causar la esporulación en la zona de contacto con el mutante nulo de *fluG*. Sin embargo, estos mutantes también esporulan en contacto con una cepa silvestre. Ello indica que hay al menos dos metabolitos relacionados con la esporulación (Etxebeste et al., 2008; Garzia et al., 2009). Si bien se puede intuir que existe una relación entre los factores FlbB y FlbE con FluG, se desconoce la identidad de los metabolitos y su papel en el proceso.

Algunos trabajos han propuesto que la función de FluG podría estar modulada por la luz. Una mutación en el gen (FluG701) afectó a la sensibilidad a la luz roja (Yager et al., 1998). Esta evidencia propició la conexión funcional entre FluG y el complejo velvet. En la misma línea, se observó que la expresión de FluG aumenta en presencia de la luz (Ruger-Herreros et al., 2011). Otro estudio en *Aspergillus flavus*, reportó mediante experimentos Yeast-Two-Hybrid la interacción molecular entre FluG y VeA (Chang et al., 2013). Esto entraría en contradicción con una distribución citoplásmica descrita anteriormente (Lee y Adams, 1994).

Ante la diversidad de informaciones e interpretaciones sobre la función de este importante factor de desarrollo asexual, el objetivo de esta tesis ha sido el de arrojar luz sobre su función mediante el uso de técnicas actualizadas de estudio en biología molecular y bioinformática.

OBJETIVOS

La línea principal de investigación de esta tesis doctoral está dedicada a la caracterización y el análisis funcional del gen *fluG* en *Aspergillus nidulans*. Este gen ha sido analizado en estudios anteriores efectuados en otros géneros de *Aspergillus*, no obstante, su papel en la regulación del desarrollo de hongo sigue siendo desconocido. Debido a ello, los objetivos generales que se plantearon al inicio del trabajo de investigación fueron:

1. Determinación de la relevancia del gen *ausA* en la inducción del desarrollo asexual, en relación con el gen *fluG*. Localización de FluG *in vivo* y primera caracterización bioinformática del gen *fluG*.
2. Estudio bioinformático del gen *fluG* y modelado estructural de la proteína, con el objeto de elucidar su función
3. Comprobación experimental de las hipótesis resultantes del análisis bioinformático de la secuencia de *fluG*.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Aspergillus nidulans*

Las cepas utilizadas en el trabajo realizado a lo largo de esta tesis, están reflejadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Fuente
TTA127.4 (BD80)	<i>yA2; ΔfluG::trpC⁺; pabaA1;trpC801; veA1</i>	(Lee y Adams, 1994)
TN02A3 (BD129)	<i>pyrG89; argB2; pyroA4; ΔnkuA::argB⁺; veA1</i>	(Nayak et al., 2006)
CRO1 (BD267)	<i>cfwA2; yA2; pabaA1; veA1</i>	(Márquez-Fernández et al., 2007)
BD688	<i>pyrG89; argB2; pyroA4; ΔausA::pyrG⁺; ΔnkuA::argB⁺; veA1</i>	Este estudio
WIM 126	<i>yA2; pabaA1; veA⁺</i>	(Butnick et al., 1984)
FGSC A#1155	<i>pyrG89; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center; (McCluskey et al., 2010)
BD824	<i>pyrG89; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio (cruce entre WIM126 x FGSC A#1155)
BD969	<i>pyrG89; ΔfluG::pyrG⁺; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio
BD970	<i>pyrG89; fluG(1-406); ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio
BD971	<i>pyrG89; fluG(427-865); ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio
BD972	<i>pyrG89; fluG(H20A;H22A); ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio
BD975	<i>pyrG89; fluG::GFP::pyrG⁺; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA⁺</i>	Este estudio

BD977	<i>pyrG89; GFP::fluG; ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD982	<i>pyrG89; alcA(p)::fluG::GFP::pyrG⁺; ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD988	<i>pyrG89; fluG::HA_{3x}::pyrG⁺; ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1145	<i>pyrG89; ΔfluG::LSEI_0440::fluG(407- 865); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1194	<i>pyrG89; fluG(1-406); ΔnkxA::bar; pyroA4; fluG(427-865)::pyrA⁺; veA+</i>	Este estudio
BD1195	<i>pyrG89; fluG(D354A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1196	<i>pyrG89; fluG(H20A;H22A;D354A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1197	<i>pyrG89; fluG(E566A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1198	<i>pyrG89; fluG(E626A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1199	<i>pyrG89; fluG(H682A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1200	<i>pyrG89; fluG(R720A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1201	<i>pyrG89; fluG(R739A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1202	<i>pyrG89; fluG(R744A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1203	<i>pyrG89; fluG(E752A); ΔnkxA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1206	<i>pyrG89; GFP::fluG; ΔnkxA::bar; pyroA4; hhoA::mRFP::pyrG⁺; veA+</i>	Este estudio
BD1207	<i>pyrG89; alcA(p)::GFP::fluG::pyrG⁺; ΔnkxA::bar; pyroA4; hhoA::mCherry::pyroA⁺; veA+</i>	Este estudio

BD1208	<i>pyrG89; HA_{3x}::fluG; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1229	<i>pyrG89; ΔfluG::PA5508; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1231	<i>pyrG89; ΔfluG::fluG(1-426)::PA5508; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1233	<i>pyrG89; ΔfluG::LSEI_0440::fluG(407-426)::PA5508; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio
BD1235	<i>pyrG89; ΔfluG::NodGS; ΔnkuA::bar; pyroA4; veA+</i>	Este estudio

2. Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, suministrados por IDT y Metabion, están reflejadas en la Tabla 2. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el paquete informático Vector NTI 10.1.1.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Construcción
ausA-PP1	GGG GAG TGC ATA GGG ATA CAG AGT ACT AAC C	Amplificación de la región 5'-UTR de <i>ausA</i>
ausA-PP2	CAT CTT TCG AAA TAA AGT GAT CTT GAC TAA AAG G	Amplificación de la región 5'-UTR de <i>ausA</i>
ausA-SMP1	CCT TTT AGT CAA GAT CAC TTT ATT TCG AAA GAT GAC CGG TCG CCT CAA ACA ATG CTC T	Generación del mutante nulo <i>ΔausA</i>
ausA-GFP2	CCA TTA CCA CAA CGA GGA TAG GCA CTA AAT ACT AAT TAG TCT GAG AGG AGG CAC TGA TGC G	Generación del mutante nulo <i>ΔausA</i>
ausA-GSP3	TAA TTA GTA TTT AGT GCC TAT CCT CGT TGT GGT AAT GG	Amplificación de la región 3'-UTR de <i>ausA</i>
ausA-GSP4	GCC CGT CTT CCA AAT CTT CGC	Amplificación de la región 3'-UTR de <i>ausA</i>

fluG-PP1	CGA CCA AAG ACA ACG CTA TTG ACC GC	5'-UTR de <i>fluG</i>
fluG-PP2	CAT GGC GAT GAA CCA GCA AAC TAA AGG	5'-UTR de <i>fluG</i>
fluG-SMP1	CCT TTA GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Generación del mutante nulo Δ <i>fluG</i>
fluG-GFP1	CGC AGG AAG TGG CTT GTG GAG AGG TAT GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC	Generación de las quimeras <i>fluG::GFP</i> y <i>fluG::HA</i>
fluG-GFP2	GGA AAT ATT GTG AAT ACG CTC AGG AGA AAG ATT AGA CTC AGT CTG AGA GGA GGC ACT GAT GCG	Generación del mutante y las quimeras Δ <i>fluG</i> , <i>fluG::GFP</i> y <i>fluG::HA</i>
fluG-GSP1	GAA CAA CCG CAA TCT GCC GC	Generación de las quimeras <i>fluG::GFP</i> y <i>fluG::HA</i>
fluG-GSP2	ATA CCT CTC CAC AAG CCA CTT CCT GCG	Generación de las quimeras <i>fluG::GFP</i> y <i>fluG::HA</i>
fluG-GSP3	TGA GTC TAA TCT TTC TCC TGA GCG TAT TCA CAA TAT TTC C	Amplificación de la región 3'-UTR de <i>fluG</i>
fluG-GSP4	CCT ACA AAC TCT GCT GAA GAC GTC GAT TCC	Amplificación de la región 3'-UTR de <i>fluG</i>
fluG-geneSP	ATG GCC ACT CTC TCT TCA CTC CGT CAT C	Generación de la quimera <i>GFP::fluG</i>
fluG-gfpSP	CCT TTA GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT	Generación de la quimera <i>GFP::fluG</i>
fluG-gfpFP	GAT GAC GGA GTG AAG AGA GAG TGG CCA TTT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT GTG T	Generación de la quimera <i>GFP::fluG</i>
HA-NT-fwd	CTT TAG TTT GCT GGT TCA TCG CCA TGG GCC GCA TCT TTT ACC CAT AC	Generación de la quimera $HA_{3x}::fluG$
HA-NT-rev	GAC GGA GTG AAG AGA GAG TGG CCT GAG CAG CGT AAT CTG GAA CG	Generación de la quimera $HA_{3x}::fluG$
fluG (1-406)-term-rev	CGC TCA GGA GAA AGA TTA GAC TCA AAG CCG GTT TGA ATT GTG G	Generación del mutante que contiene la región N-terminal de <i>fluG</i>
fluG (427-865)-prom-fwd	CCT TTA GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG CGT ATC TCG TCA ACT GAT CTG C	Generación del mutante que contiene la región C-terminal de <i>fluG</i>
FarPP1_pyroA	CGA GTG GGA TGG AAA TAC TGA GCG TCC	Amplificación de la región 5'-UTR lejana de <i>pyroA</i> , para la generación del mutante que

GSP4_pyroA	CCC TAC GAA CCA TGG CAT TCC TCA TTC AGC	contiene las regiones N- y C-terminal separadas Amplificación de la región 3'-UTR de <i>pyroA</i> , para la generación del mutante que contiene las regiones N- y C-terminal separadas
FarPP2_pyroA-fluGPP1	CGC GGT CAA TAG CGT TGT CTT TGG TCG TCC GAT GGC AAT TTA CCT GCC G	Amplificación de la región 5'-UTR lejana de <i>pyroA</i> , para la generación del mutante que contiene las regiones N- y C-terminal separadas
fluGGSP4-NrPP1-pyroA	GGA ATC GAC GTC TTC AGC AGA GTT TGT AGG ATG GAG GTT TAA CTC CGG TCA GG	Amplificación de la región 5'-UTR cercana, del gen y la región 3'-UTR de <i>pyroA</i> , para la generación del mutante que contiene las regiones N- y C-terminal separadas
HAHA-fwd	CAT CGA CAA CGC TGC TGC CAA CCT CCT CTC	Generación del mutante puntual H20A;H22A
HAHA-rev	GAG AGG AGG TTG GCA GCA GCG TTG TCG ATG	Generación del mutante puntual H20A;H22A
D354A-fwd	GTT ATG GAG TAC CGC TGG GCA TTT TTT CC	Generación de los mutantes puntuales D354A y H20AH22AD354A
D354A-rev	GGA AAA AAT GCC CAG CGG TAC TCC ATA AC	Generación de los mutantes puntuales D354A y H20A;H22A;D354A
E566A_fwd	GCG GCT TTG AGA TTG CAG TCG TTT TCT TGA AGC	Generación del mutante puntual E566A
E566A_rev	GCT TCA AGA AAA CGA CTG CAA TCT CAA AGC CGC	Generación del mutante puntual E566A
E626A_fwd	CAA CAA TTC CAT GCC GCG TCC GCC CCT GGC	Generación del mutante puntual E626A
E626A_rev	GCC AGG GGC GGA CGC GGC ATG GAA TTG TTG	Generación del mutante puntual E626A
H682A_fwd	GCA CGG CGT CCG CCG CGC ACG TTT CC	Generación del mutante puntual H682A
H682A_rev	GGA AAC GTG CGC GGC GGA CGC CGT GC	Generación del mutante puntual H682A
R720A_fwd	GCA AGC TAC GAC GCC GTT AAG TCG GGT ATT TGG	Generación del mutante puntual R720A
R720A_rev	CCA AAT ACC CGA CTT AAC GGC GTC GTA GCT TGC	Generación del mutante puntual R720A
R739A_fwd	GGG CAC CCA GAA CGC TGA GGC GCC TAT TCG	Generación del mutante puntual R739A

R739A_rev	CGA ATA GGC GCC TCA GCG TTC TGG GTG CCC	Generación del mutante puntual R739A
R744A_fwd	CGT GAG GCG CCT ATT GCC AAG ATC TCA CCA GG	Generación del mutante puntual R744A
R744A_rev	CCT GGT GAG ATC TTG GCA ATA GGC GCC TCA CG	Generación del mutante puntual R744A
E752A_fwd	CTC ACC AGG CCA TTG GGC AAT CAA GTC TCT TGA CG	Generación del mutante puntual E752A
E752A_rev	CGT CAA GAG ACT TGA TTG CCC AAT GGC CTG GTG AG	Generación del mutante puntual E752A
440fwd	GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG GAC GAC TTA TCT GAA TTT G	Generación del mutante LSEI_0440+C-terminal
440rev	CAT TTA ACT CAT AGA CGC GCA GTT CAC GCT CTT GAT GAT AAA GC	Generación del mutante LSEI_0440+C-terminal
NTP_PA5508_fwd	CCA GAC GGT CTC CGT GAA CCG CCT GCA GCC GGT ACG	Generación del mutante N-terminal+PA5508
NTP_PA5508_rev	GGC GGT TCA CGG AGA CCG TCT GGT GCC CAG ACG	Generación del mutante N-terminal+PA5508
Prom-fluG_PA5508_fwd	GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG GTG AAC CGC CTG CAG CCG G	Sustitución de <i>fluG</i> por PA5508
PA5508_Term-fluG_rev	CGC TCA GGA GAA AGA TTA GAC TCA GTA GAG CTC GGC ATA GTG GC	Sustitución de <i>fluG</i> por PA5508
Prom_NodGS_fwd	GTT TGC TGG TTC ATC GCC ATG GAG TTT AGT GAG TTA AAG GAA G	Sustitución de <i>fluG</i> por NodGS
NodGS_Term(<i>fluG</i>)_rev	CGC TCA GGA GAA AGA TTA GAC TTA GTA TCG GTG AAT GAG TTG C	Sustitución de <i>fluG</i> por NodGS
BenA_(RT-PCR)-fwd	AGA TGC GCA ACA TCC AGA GC	Amplificación del gen <i>benA</i> en la RT-PCR
BenA_(RT-PCR)-rev	CTG GTA CTC GGA GAC GAG ATC G	Amplificación del gen <i>benA</i> en la RT-PCR
fluG_N-term_RT_fwd	GCA CTC GGT TGT TAT GGA G	Amplificación de la región N-terminal de <i>fluG</i> en la RT-PCR
fluG_N-term_RT_rev	TCC ACG AAA ACC TTT TCC AG	Amplificación de la región N-terminal de <i>fluG</i> en la RT-PCR
fluG-(RT-PCR)-fwd	CTC GAA GAA ATC GCC GAA AC	Amplificación de la región C-terminal de <i>fluG</i> en la RT-PCR

fluG-(RT-PCR)-rev	CTC GGC ATG GAA TTG TTG AA	Amplificación de la región C-terminal de <i>fluG</i> en la RT-PCR
pMI_Seq._fwd	GCG ATG GCC CTG TCC	Secuenciación del extremo N-terminal de los plásmidos pMI
pMI_Seq._rev	GCT TCC GGC TCG TAT G	Secuenciación del extremo C-terminal de los plásmidos pMI
fluG(+ATG)_AscI_fwd	GGG GCG CGC CCA TGG CCA CTC TCT CTT CAC TCC	Generación de los plásmidos pMI1, pMI4 y pMI8
fluG(-ATG)_AscI_fwd	GGG GCG CGC CCG CCA CTC TCT CTT CAC TCC	Generación del plásmido pMI2
BamHI_fluG_rev	CGG GAT CCC CAT AAC AAC CGA GTG CTG GG	Generación de los plásmidos pMI1 y pMI2
BamHI_fluG(Ntrm)_rev	CGG GAT CCT CAA AGC CGG TTT GAA TTG TGG AAA AG	Generación del plásmido pMI4
AscI_fluG(Ctrm)_fwd	GGG GCG CGC CCA TGC GTA TCT CGT CAA CTG ATC TGC	Generación del plásmido pMI5
BamHI_fluG(Ctrm)_rev	CGG GAT CCT CAA TAC CTC TCC ACA AGC CAC TTC C	Generación de los plásmidos pMI5 y pMI8
AscI_LC440_fwd	GGG GCG CGC CCA TGG ACG ACT TAT CTG AAT TTG	Generación del plásmido pMI6
BamHI_LC440_rev	CGG GAT CCT CAG ACG CGC AGT TCA CGC TCT TGA TG	Generación del plásmido pMI6
AscI_PA5508_fwd	GGG GCG CGC CCA TGG TGA ACC GCC TGC AGC CGG	Generación del plásmido pMI7
BamHI_PA5508_rev	CGG GAT CCT CAG TAG AGC TCG GCA TAG TGG C	Generación del plásmido pMI7

3. Plásmidos

Los plásmidos en esta tesis fueron utilizados para ser transformados en *Aspergillus nidulans* y como vectores transbordadores de distintos genes. Todos los plásmidos tienen el gen *bla*, que confiere resistencia a la ampicilina.

3.1. Plásmidos utilizados en *A. nidulans*

Los plásmidos utilizados para el etiquetado de *fluG* en *Aspergillus nidulans* están detallados a continuación:

- **pNT5:** Este plásmido contiene el gen GFP regulable bajo el promotor *alcA(p)*, y está diseñado para etiquetar GFP al extremo N-terminal de las proteínas. Como marcador auxotrófico se encuentra el gen *pyr4* de *N. crassa*, adecuado para complementar la auxotrofia inducida por la mutación *pyrG89*. Contiene también un fragmento de 0.7 kb del gen *teaA* en los sitios de restricción *AscI* y *PacI* (Takeshita et al., 2008).
- **pMI1:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1 kb de la región N-terminal de *fluG* (+ATG) introducido con los oligonucleótidos *fluG(+ATG)_AscI_fwd* y *BamHI_fluG_rev* (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.
- **pMI2:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1 kb de la región N-terminal de *fluG* (-ATG) introducido con los oligonucleótidos *fluG(-ATG)_AscI_fwd* y *BamHI_fluG_rev* (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.
- **RAFL25-23-P17:** Este plásmido contiene un fragmento de 2,5 kb del cDNA correspondiente al gen NodGS (**Nodulin Glutamine Synthetase**) (At3g53180), dentro del vector pBlueScript KS(+) modificado.

3.2. Plásmidos utilizados para expresión en *E. coli*

Los plásmidos utilizados para la expresión de *fluG* en *Escherichia coli* se detallan a continuación:

- **pMI4:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1,2 kb del ADNc de la región N-terminal de *fluG* (+ATG) introducido con los oligonucleótidos *fluG(+ATG)_AscI_fwd* y *BamHI_fluG(Ntrm)_rev* (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.
- **pMI5:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1,3 kb del ADNc de la región C-terminal de *fluG* (+ATG) introducido con los oligonucleótidos *AscI_fluG(Ctrm)_ fwd* y *BamHI_fluG(Ctrm)_rev* (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.
- **pMI6:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1,1 kb del gen LSEI_0440 (+ATG) de *Lactobacillus paracasei* introducido con los oligonucleótidos *AscI_LC440_ fwd* y *BamHI_LC440_rev* (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.
- **pMI7:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 1,3 kb del gen PA5508 (+ATG) de *Pseudomonas aeruginosa* introducido con los oligonucleótidos

AscI_PA5508_ fwd y BamHI_PA5508_rev (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.

- **pMI8:** Plásmido pNT5 con un fragmento de 2,6 kb del ADNc del gen *fluG* (+ATG) introducido con los oligonucleótidos *fluG*(+ATG)_AscI_fwd y BamHI_*fluG*(Ctrm)_rev (Tabla 2) en los sitios de restricción *AscI* y *BamHI*.

4. Medios y condiciones de cultivo de *Aspergillus nidulans*

La composición y preparación de los medios de cultivo Cove (1966) y Käfer (1965), los cuales fueron actualizados recientemente (Hill y Käfer, 2001) figuran en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente. La preparación de los suplementos nutricionales utilizados se detalla en la Tabla 5. Salvo que se indique lo contrario, tanto los cultivos líquidos como los sólidos se incubaron a 37 °C durante intervalos de tiempo definidos en cada protocolo. Los medios utilizados para el cultivo y la caracterización fenotípica del hongo fueron el medio mínimo de *Aspergillus* (MMA) y el medio completo de *Aspergillus* (MCA), que se detallan en la Tabla 3. En los experimentos de microscopía de fluorescencia, no obstante, se utilizó el medio mínimo “Watch” (WMM) definido por (Peñalva, 2005), cultivado a 25 °C sin agitación. Salvo que se indique lo contrario, todos los medios se esterilizaron por autoclave a 110 °C durante 20 min a una presión de 1,5 bar, y posteriormente se les añadió 100 mL de D(+)-glucosa (2 % p/v) y 10 mL de tartrato amónico (5 mM) para preparar un litro de medio junto con los suplementos nutricionales requeridos para cada cepa (Tabla 5).

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados en *Aspergillus nidulans*

Medios de cultivo	Cantidades por litro	
Medio mínimo <i>Aspergillus</i> (MMA) sólido	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	Agar	15 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
Medio mínimo <i>Aspergillus</i> (MMA) líquido	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
Medio completo <i>Aspergillus</i> (MCA) sólido	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	Extracto de levadura	5 g
	Agar	15 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	

	Esterilizar en autoclave	
Medio completo <i>Aspergillus</i> (MCA) líquido	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	Extracto de levadura	5 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
Medio de regeneración (MMR)	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	D(+)-Sacarosa (1 M)	342 g
	Agar (medio sólido)	15 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
Medio de regeneración-TOP (MMR-TOP)	Solución de sales y elementos traza	20 mL
	D(+)-Sacarosa (1 M)	342 g
	Agar (medio sólido)	6 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
Medio mínimo "Watch" (WMM)	Elementos traza	1 mL
	KCl (17 mM)	0,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (5 mM)	0,5 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
	Solución NaH ₂ PO ₄ 5 M (25 mM)	5 mL
	Solución de D(+)-glucosa (0,1 % (p/v))	5 mL
	Solución de tartrato amónico (5 mM)	10 mL

Tabla 4. Soluciones utilizadas para los medios

Soluciones	Cantidades por litro	
Elementos traza (10 ³ x)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 g
	H ₃ BO ₃	11 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5 g
	FeSO ₄ ·2H ₂ O	5 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,6 g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,6 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,1 g
	Na ₂ EDTA	50 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con NaOH)	
	Cubrir la botella con papel de aluminio	
	Esterilizar en autoclave	
Sales + Elementos traza (50x)	KCl	26 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	26 g
	KH ₂ PO ₄	72 g
	50 mL de elementos traza	

	Cubrir la botella con papel de aluminio
	Esterilizar en autoclave
D(+)-glucosa (10x)	D(+)-glucosa 200 g
	Esterilizar en autoclave
Tartrato amónico (100x)	Tartrato amónico 92 g
	Esterilizar en autoclave
NaH ₂ PO ₄ 5 M	NaH ₂ PO ₄ 599,9 g
	Esterilizar en autoclave

Tabla 5. Preparación de suplementos

Suplementos	Cantidades por litro
Biotina (10 ⁴ x)	Biotina 0,1 g
	Esterilizar por filtración (0,45µm)
Ácido p-aminobenzoico (Paba) (10 ³ x)	Ácido p-aminobenzoico 2 g
	Esterilizar por autoclave
Piridoxina (Pyro) (10 ³ x)	Piridoxina 0,5 g
	Esterilizar por filtración (0,45µm)
Uridina	122 mg/100 mL de medio
Uracilo	56 mg/100 mL de medio

5. Recuento de conidias y cleistotecios y pesaje de colonias

5.1. Recuento de conidias

Se inocularon las cepas con en método de inoculación-puntual y se incubaron durante 72 horas. Finalizado el periodo de incubación, se recogieron las colonias cortando el agar por el perímetro de la colonia y se dispersaron las esporas vertiendo el trozo de agar en un tubo de 50 mL con una solución de Tween[®] 20 al 0,02 % (v/v) y se agitaron utilizando un vortex a velocidad máxima durante un minuto, dos veces. Se contaron las esporas utilizando un hematocitómetro (celda Thoma) en un microscopio (Optihot, Nikon). El área de la colonia se midió fotografiando las colonias, y tratando las imágenes utilizando el programa Digimizer 4.6.1 (MedCalc Software bvba). Los contajes se hicieron en tres tandas con al menos cuatro réplicas cada una y se utilizó el test de Grubbs para detectar ‘outliers’ (Grubbs, 1969). El número de esporas por cm² se calculó a través de la división de la concentración de conidias por el diámetro de la colonia.

5.2. Recuento de cleistotecios

Se sembraron placas Petri con 1x10⁵ conidias en forma de césped, se sellaron las placas con Parafilm[®] M (Bemis) en el perímetro de las placas y se taparon con papel de

aluminio. Se incubaron a 37 °C durante 7 días. Finalizado el periodo de incubación, se recogieron 4 discos de 15 mm de diámetro para cada cepa, se pulverizaron con una solución de etanol cosmético al 96 % para eliminar de la superficie las estructuras de esporulación asexuales y se fotografiaron los cleistotecios con una lupa binocular Nikon SMZ8000 a 20x aumentos para posteriormente ser contados utilizando el programa de tratamiento de imágenes Fiji (Schindelin et al., 2012).

5.3. Pesaje de colonias

Para los experimentos de pesaje, se cortaron membranas de diálisis (Spectra/Por® 6) con un límite de peso molecular de 3,5 kDa y se esterilizaron en las mismas condiciones que los medios. Una vez estériles, se colocaron las membranas encima de los cultivos de crecimiento, se sembraron las cepas con el método de inoculación-puntual y se incubaron durante 72 horas. Finalizado el periodo de incubación, se recogieron las colonias separándolas de la membrana y se dejaron secar a 80 °C toda la noche. En los casos en los que se cortó la colonia del agar, este último se eliminó derritiéndolo con agua caliente (80 °C) y secando la colonia a 80 °C toda la noche. El área de la colonia se midió fotografiando las placas sobre la membrana, y tratando las imágenes utilizando el programa Digimizer 4.6.1. Los pesajes se hicieron en tres tandas con al menos cuatro réplicas cada una y se utilizó el test de Grubbs para detectar ‘outliers’ (Grubbs, 1969). El número de miligramos por cm² se calculó a través de la medida del diámetro de la colonia y los pesajes obtenidos.

6. Experimentos de contacto entre colonias

Todos los experimentos de contacto se llevaron a cabo en placas de 90 mm de diámetro con MCA. Las cepas se inocularon puntualmente con un centímetro de separación y se incubaron hasta que entraban en contacto. A partir de ese momento, se siguieron cultivando durante 96 horas. Finalizado el periodo de incubación, se fotografiaron las zonas de contacto con una lupa binocular Nikon SMZ8000 a 20x aumentos.

7. Transformación de *Aspergillus nidulans*

La obtención de los protoplastos de *Aspergillus nidulans* se realizó mediante el protocolo descrito por (Szewczyk et al., 2006), mientras que transformación de

protoplastos se realizó utilizando el protocolo descritos por (Tilburn et al., 1983). Las soluciones necesarias para llevar a cabo ambos procesos están detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6. Soluciones utilizadas en la transformación de *A. nidulans*

Soluciones	Cantidades por 100 mL	
KCl 0,6 M	KCl	4,47 g
	Esterilizar en autoclave	
KCl 0,6 M + CaCl ₂ 50 mM	KCl	4,47 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,74 g
	Esterilizar en autoclave	
KCl 1 M + Ácido cítrico 0,1 M	KCl	8,20 g
	Ácido cítrico monohidratado	2,10 g
	Esterilizar en autoclave	
	Guardar a 4 °C	
D(+)-Sacarosa 1,2 M	D(+)-Sacarosa	41,08 g
	Esterilizar en autoclave	
Solución 7	Sorbitol	18,22 g
	Tris-HCl (1 M, pH=7,5)	1 mL
	CaCl ₂ (1 M)	1 mL
	Esterilizar en autoclave	
Solución 8	Polietilenglicol (PEG6000)	60 g
	Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	1 mL
	CaCl ₂ (1 M)	1 mL
	Añadir 10 mL de agua destilada, fundir en el microondas y enrasar a 100 mL	
	Esterilizar en autoclave	
Solución de obtención de protoplastos (Prepararla 30 minutos antes de empezar el proceso de digestión)	VinoTaste [®] Pro (Novozymes)	2,048 g
	KCl 1 M + Ácido cítrico 0,1 M	16 mL
	Centrifugar hasta que se disuelva el VinoTaste [®] y reposar en hielo.	

7.1. Obtención de protoplastos

Se obtuvieron esporas de la cepa a ser transformada en un tubo de 50 mL que contenía una solución de Tween[®] 20 al 0,02 % (v/v) y se agitó utilizando un vortex. La suspensión resultante de esporas se filtró a través de Miracloth (Calbiochem[®], d_p = 22-25 µm) estéril y posteriormente se le eliminó la solución de Tween centrifugando a 4000 rpm durante 5 minutos. Se añadió solución de Tween nuevamente y se contaron las esporas. Se inocularon 150 mL de MCA líquido y los suplementos necesarios con 2,5·10⁶ conidias/mL en un matraz de 500 mL. El inóculo se incubó durante 14 horas a 28 °C con agitación (180 rpm). Una vez transcurrido el periodo de incubación, se filtró el

micelio a través de Miracloth estéril sin prensar el micelio y se lavó con MCA líquido con el objeto de eliminar el Tween residual. Se pesaron entre 1 y 1,5 g de micelio y se depositaron en un tubo de 50 mL que contenía 16 mL de solución de obtención de protoplastos (Tabla 6) y 16 mL de MCA líquido con los suplementos requeridos. Se incubó la mezcla a 30 °C en agitación (100 rpm) durante 90-120 minutos. Durante el proceso de digestión, se agitó la suspensión a baja velocidad durante 5 segundos utilizando un vortex cada 15 minutos para favorecer la separación de los protoplastos y el micelio. Se observó la aparición de protoplastos aproximadamente a los 60 minutos de incubación. Una vez obtenidos los protoplastos, se dividió la mezcla en dos tubos de 50 mL que contenían 16 mL de la solución de D(+)-sacarosa 1,2 M; la mezcla se añadió lentamente utilizando una pistola auxiliar de pipeteado (Accu-Jet®, Brand). Una vez añadida la mezcla de protoplastos a la sacarosa, se procedió a centrifugar los tubos a 1800 g durante 10 minutos a 4 °C (Sorvall™ Biofuge Primo R, Thermo Scientific). Tras haber finalizado la centrifugación, se recogió la banda de protoplastos de la interfase entre la sacarosa y la mezcla de protoplastos (sin micelio) y se depositó en un tubo de 50 mL previamente enfriado en hielo. Posteriormente, se añadió a los protoplastos recogidos de la interfase el doble del volumen de KCl 0,6 M frío y se mezcló suavemente por inversión. Se volvió a centrifugar la mezcla resultante a 1800 g durante 10 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se procedió a resuspender el precipitado de protoplastos en 2 mL de KCl 0,6 M frío. La suspensión de protoplastos resultante se dividió en dos tubos de 2 mL y se centrifugó a 2400 g durante 3 minutos a temperatura ambiente (Sorvall™ Legend™ Micro 21R, Thermo Scientific). Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron ambos precipitados en un único tubo de 1 mL de KCl 0,6 M. Previa la transformación de los protoplastos, se centrifugó el tubo a 2400 g durante 3 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió finalmente el precipitado en 1 mL de KCl 0,6 M y CaCl₂ 50 mM.

7.2. Transformación de protoplastos

Una vez obtenidos los protoplastos y estando re-suspendidos en la solución KCl 0,6 M y CaCl₂ 50 mM se añadieron 100 µL de la suspensión de protoplastos y 10 µL de ADN en un tubo de 50 mL; a modo de control, se añadieron otros 100 µL de la suspensión de protoplastos a otro tubo de 50 mL, pero no se añadió ADN. Acto seguido, se mezcló el contenido mediante agitación por vortex entre 6 y 8 veces durante 2 segundos a velocidad máxima; este paso es crítico para asegurar una buena eficiencia en la

transformación. A continuación, se 50 μ L de solución 8 (a temperatura ambiente) añadieron a cada tubo y se mezclaron mediante agitación por vortex 4-6 veces durante 2 segundos a la misma velocidad que el anterior paso. Inmediatamente, se introdujeron los tubos en hielo y se incubaron durante 25 minutos. Una vez finalizada la incubación, se añadió 1 mL de solución 8 a ambos tubos y se homogenizaron las muestras por golpeteo con los dedos; se dejaron incubar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 5 mL de solución 7 a temperatura ambiente y luego MMR-TOP hasta los 20 mL, este último, previamente fundido y mantenido a 50 °C hasta el momento de la transformación. Las mezclas resultantes se vertieron en cinco placas, de las cuales, una contenía medio no selectivo, y cuatro contenían medio selectivo. En el caso del tubo que contenía el control sin ADN, se vertió la mezcla en dos placas, de las cuales una contenía MMR con medio no selectivo (en el cual deberían germinar y crecer los protoplastos) para confirmar la viabilidad de los protoplastos y una placa que contenía MMR con medio selectivo a modo de control negativo (en el que no debería de crecer nada) para verificar que no hubiera contaminantes. Por otro lado, el contenido del tubo con ADN se vertió en tres placas de MMR con medio selectivo para que solo crecieran aquellos protoplastos que habían sido transformados. Las placas se incubaron durante 3-5 días. Finalmente, las colonias transformates fueron aisladas y refrescadas en placas que contenían medio selectivo para confirmar que no era un contaminante.

8. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

8.1. Generación de mutantes nulos y etiquetado de genes con o sin promotor inducible

Los casetes genómicos que se han utilizado en esta tesis para la delección y el etiquetado de genes de *A. nidulans* fueron construidos utilizando los protocolos de PCR de fusión (Yang et al., 2004) y Touchdown PCR y (Korbie y Mattick, 2008). Los casetes que se diseñaron para la generación de mutantes nulos se construyeron amplificando mediante PCR por un lado los fragmentos correspondientes a la región 5'-UTR o promotor y la región 3'-UTR o terminador del gen candidato a ser delecionado.

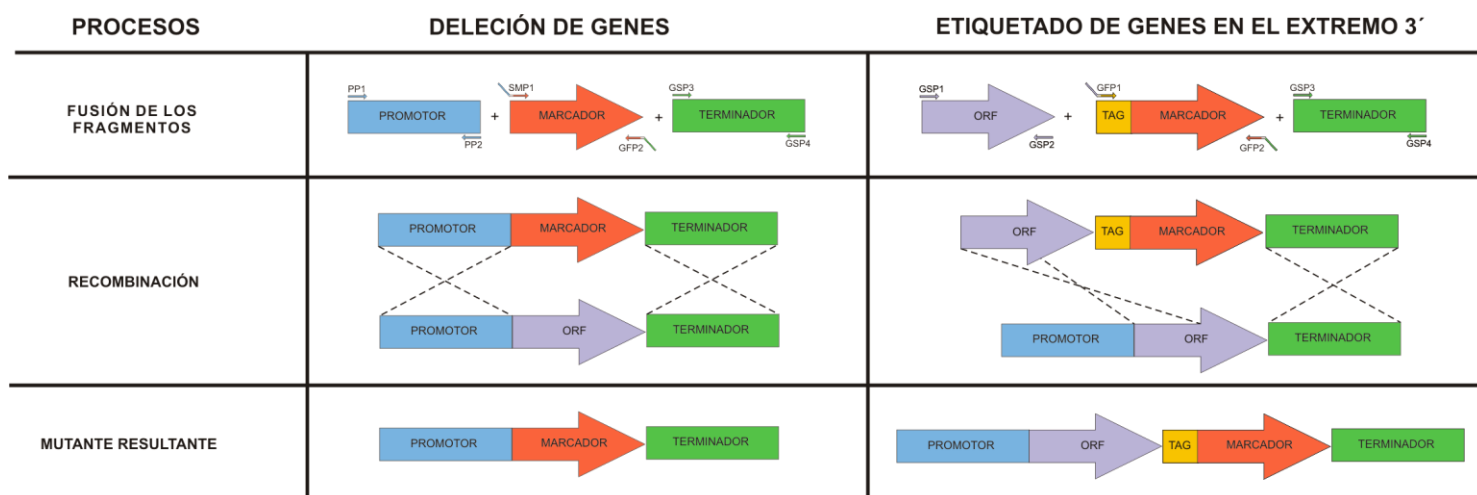


Figura 8. PCR de fusión y etiquetado de genes. Delección de genes: Primero, se amplificaron el promotor (azul), el marcador de selección (naranja) y el terminador (verde) utilizando los oligonucleótidos específicos (PP, Promoter Primer y GSP, Gene Specific Primer) PP1/PP2, SMP1/GFP2 y GSP3/GSP4, respectivamente. Los oligonucleótidos SMP1 y GFP2, han sido diseñados con una región complementaria al final del promotor y principio del terminador, respectivamente. Acto seguido, los fragmentos se fusionaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PP1 y GSP4. El gen a deleccionar (morado) es reemplazado en la transformación mediante recombinación del producto de PCR, el cual contiene el marcador de selección. **Etiquetado de genes en el extremo 3':** Primero, se amplificaron 1,5 kb del gen a etiquetar (sin codón stop; morado), el epítipo (amarillo) junto al marcador de selección (naranja) y el terminador (verde) utilizaron los pares de oligonucleótidos GSP1/GSP2, GFP1/GFP2 y GSP3/GSP4, respectivamente. Los tres fragmentos se fusionaron utilizando los oligonucleótidos GSP1 y GSP4. El gen a etiquetar, es reemplazado por el producto de fusión con el epítipo deseado (TAG: GFP, mRFP o HA_{3X}).

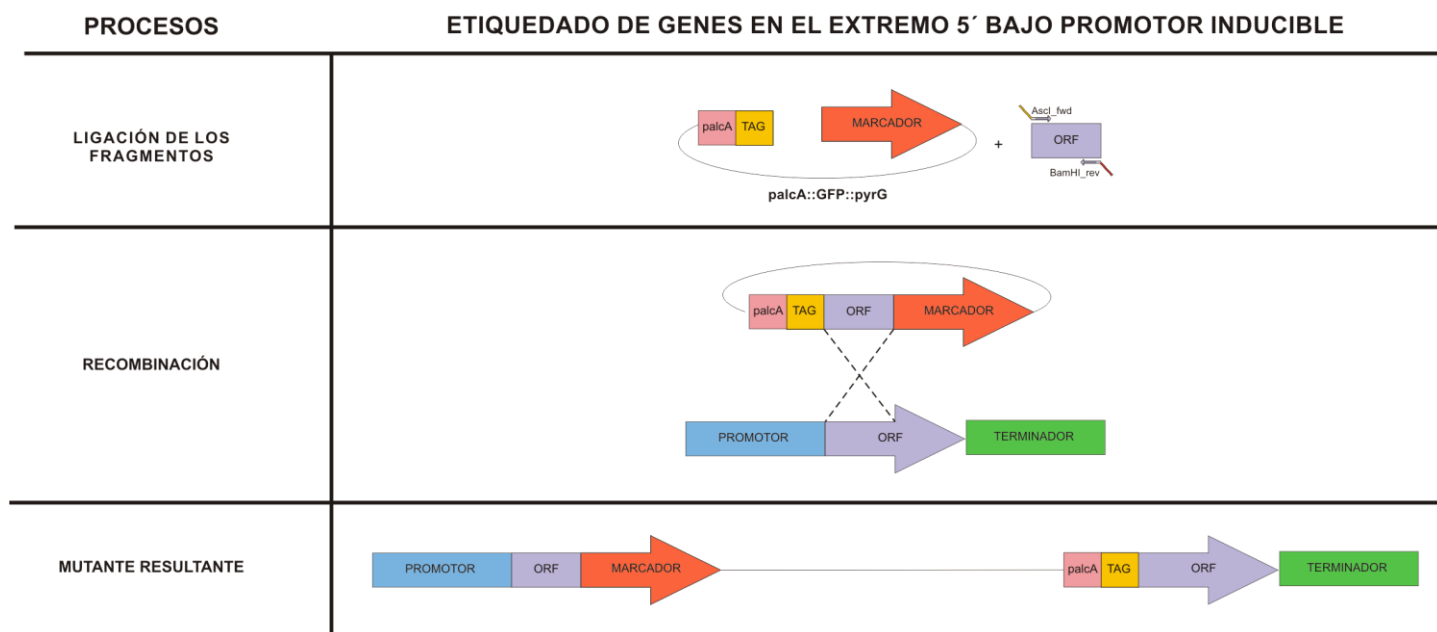


Figura 7. Construcción de los plásmidos bajo promotor inducible: Para llevar a cabo la digestión del fragmento de 1 kb del gen *fluG* (morado) y el plásmido pNT5, el cual contiene el promotor inducible *alcA* (rosa) el epítipo de interés (amarillo) y el marcador genético (naranja), se utilizaron las enzimas de restricción *AscI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Una vez llevada a cabo la ligación, los plásmidos se secuenciaron para descartar la presencia de mutaciones no deseadas. Tras llevar a cabo la transformación y recombinación del plásmido en la región de 1 kb del gen *fluG*, la correcta integración se confirmó mediante Southern blot.

Por otro lado, se amplificó el marcador de selección que se deseaba insertar en lugar del gen diana, empleando oligonucleótidos con colas complementarias al extremo 3' del promotor y al extremo 5' del terminador que fueron amplificados previamente. Una vez obtenidos los tres fragmentos, se fusionaron mediante PCR de fusión o Touchdown PCR, quedando el marcador de selección entre los fragmentos correspondientes al promotor y terminador (Figura 8).

El etiquetado de proteínas se efectuó tanto en el extremo amino (5' del gen) como el carboxilo terminal (3' del gen) con los epítomos GFP, HA_{3x}, mRFP o mCherry. El etiquetado del extremo amino terminal se efectuó amplificando mediante PCR por un lado los fragmentos correspondientes a la región 5'-UTR o promotor y un fragmento que contenía el gen candidato a ser etiquetado y la región 3'-UTR o terminador del mismo gen. Por otro lado, se amplificó el epítomo que se deseaba insertar en el extremo amino terminal del gen, empleando oligonucleótidos con colas complementarias al extremo 3' del promotor y al extremo 5' del gen que fueron amplificados previamente. Una vez obtenidos los tres fragmentos, se fusionaron mediante PCR de fusión o Touchdown PCR, quedando el epítomo entre los fragmentos correspondientes al promotor y el gen con el terminador (Figura 8). El etiquetado en el extremo carboxilo terminal se efectuó amplificando una región de 1,5 kb del extremo carboxilo terminal del gen candidato a ser etiquetado, y el terminador del mismo gen. De la misma forma, se amplificó un fragmento que contenía el epítomo que se deseaba insertar en el extremo carboxilo terminal junto con un marcador de selección adecuado, utilizando oligonucleótidos con colas complementarias al extremo 3' del gen que se quería etiquetar y al extremo 5' del terminador que fueron amplificados previamente (Figura 8).

El etiquetado en el extremo amino terminal bajo el promotor inducible *alcA(p)* se llevo a cabo utilizando el plásmido pNT5 3.1. Plásmidos utilizados en *A. nidulans*). Para ello, se amplificaron aproximadamente 1 kb (sin el codón ATG) del gen *fluG* y se emplearon las técnicas de digestión y ligación detalladas en el apartado 10.4. Digestión y ligación de plásmidos y fragmentos de ADN para llevar a cabo la construcción del plásmido (Figura 7).

8.2. Extracción de ADN genómico

Esta técnica se utilizó siguiendo el protocolo de (Sambrook et al., 1989).

Para extraer ADN genómico se inocularon 1×10^6 conidias/mL de cada cepa en un matraz de 100 mL con 25 mL de MMA líquido junto con los suplementos necesarios y se cultivó a 37 °C toda la noche en agitación (220 rpm). El micelio se filtró a través de Miracloth, se introdujo en tubos cónicos de 2 mL y se liofilizó (Cryodos, Telstar®) toda la noche. Una vez recogido el micelio liofilizado, se añadió una bola de acero inoxidable de 3,2 mm de diámetro (Next Advance) y se pulverizó el micelio liofilizado con el homogeneizador (Mini-Beadbeater, Biospec) en dos pulsos de 5 segundos con agitación mediana. Acto seguido, se retiró la bola y se añadió 1 mL de la solución TSE (Tabla 7), 100 μ L de SDS al 10 % (p/v) y se resuspendió la muestra por pipeteo hasta que el micelio pulverizado quedase completamente húmedo.

Tabla 7. Soluciones utilizadas en la extracción de ADN genómico de *A. nidulans*

Soluciones	Preparación para 100 mL
Tris-HCl 1 M (pH 8,0)	Trizma® 12,114 g
	Ajustar el pH a 8,0 (con HCl)
D(+)-sacarosa 1 M	D(+)-sacarosa 34,23 g
EDTA 0,5 M	EDTA 18,61 g
Solución TSE (Tris-HCl 25 mM / D(+)-Sacarosa 250 mM / EDTA 20 mM)	Tris-HCl 1 M (pH 8,0) 2,5 mL
	D(+)-sacarosa 25 mL
	EDTA 0,5 M 4 mL
SDS 10 %	SDS 10 g
NaOAc 3 M (pH 6)	NaOAc 24,609 g
	Ajustar el pH a 6,0 (con OAc)
Fenol/Sevag (Sevag = Cloroformo:Alcohol isoamílico; 24:1)	Fenol orgánico 25 mL
	Cloroformo 24 mL
	Alcohol isoamílico 1 mL
	Guardar a 4 °C

Se incubó la mezcla durante 15 minutos a 65 °C, mezclando el lisado por leve golpeteo manual durante la incubación. Acto seguido, se añadió 1 mL de Fenol/Sevag (Tabla 7), se agitó la mezcla vigorosamente en vortex y se continuó con una agitación por inversión regular durante 10 minutos. Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos a máxima velocidad y se separó la fase orgánica y la acuosa. Se recogió la fase superior (acuosa) en otro tubo de 2 mL y se repitió la fenolización.

Una vez terminada la segunda fenolización, se añadió a la fase acuosa 0,1 y 0,6 volúmenes de NaOAc 3 M (Tabla 7) e isopropanol, respectivamente, respecto al volumen

recogido previamente. La mezcla se mezcló por inversión y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (en este punto un pellet blanco de ADN se hacía visible). Se centrifugó durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante por aspiración y se le añadió 1 mL de EtOH al 80 % (v/v) para lavar el precipitado. Se volvió a centrifugar la muestra a máxima velocidad y se retiró el etanol mediante aspiración. El precipitado se resuspendió en 400 µL de agua Milli-Q® (Millipore™), se añadieron 4 µL de ARNasa (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) y se incubó a 37 °C durante 45 minutos para eliminar el ARN presente en la muestra. Se volvieron a añadir 0,1 y 0,6 volúmenes de OAcNa (3 M) e isopropanol, respectivamente y se mezcló por inversión. A continuación, utilizando una punta de pipeta, se recogió la madeja de ADN y se transfirió a un tubo de 2 mL con 500 µL de EtOH al 80 % (v/v). Seguidamente, se centrifugó la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos a máxima velocidad y se eliminó el etanol en vacío. Se dejó secar el ADN con el tubo abierto para eliminar los restos de etanol y se resuspendió en 200 µL de agua Milli-Q®. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) para comprobar el estado y el tamaño del ADN extraído.

8.3. Southern Blot

Esta técnica diseñada por (Sambrook et al., 1989) se utilizó para comprobar que la recombinación de los distintos fragmentos de ADN en los transformantes de *Aspergillus nidulans* se había desarrollado correctamente. Las soluciones utilizadas están detalladas en la Tabla 8. El etiquetado y detección de las sondas se realizó con el kit DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

Una vez se comprobó el estado de las alícuotas de ADN obtenidas mediante el método de extracción de ADN descrito anteriormente, se procedió a digerirlas con una endonucleasa de restricción que permitiera distinguir la correcta recombinación del fragmento a insertar en el locus adecuado, respecto al ADN de la cepa parental. Se efectuó la digestión en función de las instrucciones del fabricante, y se dejó incubando a 37 °C durante toda la noche. Una vez finalizada la digestión, se procedió a separar los fragmentos por su peso molecular mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v), durante 2-3 horas. Una vez finalizada la electroforesis, se expuso el gel a luz UV (320 nm, Vilber Lourmat) durante 5 minutos para que los fragmentos de ADN separados sufriesen una mayor degradación, con el objetivo de facilitar la transferencia de fragmentos de gran tamaño. Acto seguido, se depositó el gel en una fuente y se separaron

las dobles hebras del ADN añadiéndole la solución desnaturalizante hasta cubrir todo el gel y dejándolo incubar durante 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la solución, y se efectuaron dos lavados con solución neutralizante durante 30 minutos. Finalizado este paso, se procedió a preparar el montaje para transferir los fragmentos de ADN a una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-Probe® blotting, BioRad) por capilaridad utilizando la solución de SSC 20x como fase móvil, y se dejó que la transferencia discurriese durante toda la noche.

Tabla 8. Soluciones utilizadas en el Southern blot

Soluciones	Cantidades por litro	
Solución desnaturalizante	NaCl (1,5 M)	87,66 g
	NaOH (0,5 M)	20 g
Solución neutralizante	NaCl (3 M)	175,3 g
	Trizma® (0,5 M)	60,59 g
	Ajustar el pH a 7,5 (con HCl)	
SSC 20x	NaCl (3 M)	175,3 g
	Sodio citrato (0,3 M)	88,22 g
	Ajustar el pH a 7,0 (con HCl)	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (1 M)	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177,9 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1 M)	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	133,99 g
Solución de fosfato de sodio (1 M)	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (1 M)	600 mL
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1 M)	400 mL
	Ajustar el pH a 7 (con HCl)	
Solución Church	Bovine Serum Albumine (BSA) (1 %)	10 g
	Solución de fosfato de sodio 1 M (0,5 M)	500 mL
	EDTA (0,5 M, pH 8) (0,1 M)	2 mL
	SDS 20 % (7 %)	350 mL
SSC-N 2x + SDS 0,1 % (p/v)	SSC 20x	100 mL
	SDS 20 %	5 mL
SSC-N 0,5x + SDS 0,1 % (p/v)	SSC 20x	25 mL
	SDS 20 %	5 mL
Solución de lavado	Ácido maleico (0,1 M)	11,6 g
	NaCl (0,15 M)	8,77 g
	Tween® 20 al 0,3 % (v/v)	3 mL
	Ajustar el pH a 7,5 (con NaOH sólido)	
Ácido maleico	Ácido maleico (0,1 M)	11,6 g
	NaCl (0,15 M)	8,77 g
	Ajustar el pH a 7,5 (con NaOH)	
Solución de detección	Trizma® (0,1 M)	12,11 g
	NaCl (0,1 M)	5,8 g
	Ajustar el pH a 9,5 (con HCl)	

El mismo día en que se preparó el montaje para la transferencia, se procedió a generar la sonda que utilizaríamos para hibridarla a nuestro fragmento. La sonda se generó en un tubo de 1,5 mL en el que se añadieron 16 μ L de ADN del fragmento a utilizar como sonda y se desnaturalizó a 95 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se dejó enfriar el tubo en hielo durante 5 minutos y se le añadieron 4 μ L de digoxigenina-dUTP (DIG-High Prime, Roche); se incubó la mezcla a 37 °C toda la noche. Tras la incubación, se inactivó la reacción añadiendo 2 μ L de EDTA (0,2 M, pH = 8) y calentándola a 65 °C durante 10 minutos.

Finalizada la transferencia, se fijó el ADN a la membrana exponiéndola a dos pulsos de 120 mJ de luz UV (Vilber Lourmat UV-Crosslinker BLX-E254, 254 nm); acto seguido, se introdujo la membrana en un tubo de hibridación (Labnet) y se realizó la pre-hibridación añadiendo 25 mL de la solución Church (Church y Gilbert, 1984)dejándolo incubar a 42 °C durante 2 horas y media. 10 minutos antes de que finalizara la pre-hibridación, se desnaturalizó la sonda a 95 °C durante 5 minutos, y se dejó enfriar en hielo hasta que finalizara la pre-hibridación. Acto seguido, se añadieron 5 μ L de sonda desnaturalizada al tubo, y se dejó hibridar la sonda a 42 °C toda la noche.

Una vez terminada la hibridación, se procedió a efectuar lavados a la membrana. Para el primer lavado, se añadieron 30 mL de la solución SSC-N 2x + SDS 0,1 % (p/v) y se agitó el vial con suavidad durante 5 minutos a temperatura ambiente, dos veces. Para el segundo lavado, se añadieron 40 mL de la solución SSC-N 0,5x + SDS 0,1 % (p/v) y se efectuó el lavado en el horno de hibridación (ProBlot™ Hybridization Oven, Labnet) durante 15 minutos a 65 °C, dos veces. Seguidamente, se realizó un lavado añadiendo 40 mL de la solución de lavado y se agitó el vial con suavidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el lavado, se procedió a bloquear la membrana en solución de bloqueo, preparada a partir 4 mL de un Stock 10x de solución de bloqueo (1 g de Blocking Reagent (suministrado por el kit) + 10 mL ácido maleico) y 36 mL de ácido maleico, incubándola durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiraron 20 mL de la solución de bloqueo, se añadieron 2 μ L de anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1/10000, 75 mU/mL, Roche) y se incubó durante 30 minutos. Finalizado el periodo de incubación, de realizaron otros dos lavados añadiendo 30 mL de solución de lavado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Acto seguido, se añadieron 20 mL de solución de detección y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Finalizado este paso, se extrajo la membrana del vial de hibridación, y se depositó entre dos membranas de plástico a las que previamente se le había añadido en forma de gotas aproximadamente 1 mL del reactivo CSPD (Roche) para activar la reacción quimioluminiscente. Se retiraron las burbujas (si las hubiera) y se dejó incubar la membrana durante 5 minutos. Tras haber finalizado la incubación, se incubó nuevamente la membrana a 37 °C durante 10 minutos para aumentar la señal de quimioluminiscencia. Finalizada esta última incubación, se reveló la membrana (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad) para visualizar si el tamaño de los fragmentos de nuestros transformantes era el correcto.

8.4. Mutagénesis dirigida

Los distintos mutantes puntuales en el gen *fluG* (Tabla 2) se generaron por transformación y posterior recombinación de fragmentos amplificados que contenían la mutación seleccionada con la secuencia cromosómica (PCR mutagénica). A la hora de diseñar los oligonucleótidos necesarios para generar los citados fragmentos, por un lado, se prestó especial atención en cambiar la menor cantidad de bases posible para que se transcribiese el codón deseado, y por otro lado se flanqueó la región que contenía el codón candidato a ser mutado con 12-15 nucleótidos para favorecer un correcto anillamiento de los oligonucleótidos en la PCR mutagénica. Los casetes que se diseñaron para la generación de los mutantes puntuales se construyeron amplificando mediante PCR dos fragmentos, en los que uno contenía la región 5'-UTR junto con el parte del gen *fluG* hasta llegar a la zona que contenía la mutación y el otro contenía la misma zona que contenía la mutación y la región 3'-UTR del gen *fluG*. Todas las fusiones para la generación de los casetes con los fragmentos que contenían las mutaciones (E566A, E626A, H628A, R720A, R739A, R744A, E752A) se hicieron utilizando el método Touchdown PCR. Una vez obtenidos los fragmentos fusionados, estos fueron transformados en protoplastos de una cepa $\Delta fluG$ para inducir la recombinación en el locus original del gen *fluG* (Figura 9) y se seleccionaron aquellos transformantes que crecían en un medio que contenía 5-FOA (2 mg/mL de medio) (Oakley et al., 1987). Finalmente, se comprobó la correcta inserción de los casetes mediante Southern blot. Los mutantes fueron posteriormente secuenciados para confirmar que no hubiera ninguna mutación no deseada.

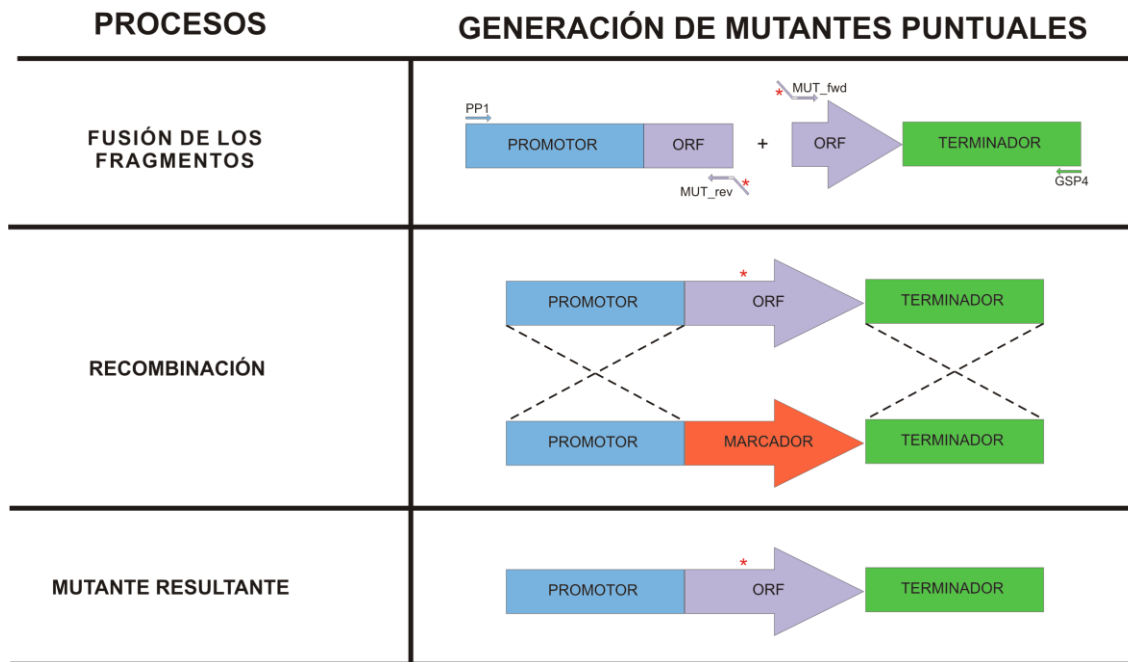


Figura 9. Construcción de los mutantes puntuales de *fluG*: Utilizando oligonucleótidos que codificaran una alanina que sustituyera un aminoácido de interés, se amplificaron el promotor (azul) junto con una parte del gen con el residuo mutado (morado con asterisco rojo) y el terminador (verde) junto con la región resultante del gen con el residuo mutado. Cada uno de los fragmentos que contenían las mutaciones puntuales transformado en una cepa $\Delta fluG::pyrG^{Af}$, dándose la recombinación en el *locus pyrG* (naranja). La correcta integración se confirmó mediante Southern blot y se secuenciaron las cepas para confirmar la presencia de la mutación deseada.

8.5. Inducción de la expresión

Los experimentos de inducción se efectuaron en cepas que contenían el gen *fluG* regulado bajo el promotor *alcA(p)*, el cual puede ser inducido al utilizar fuentes de carbono como el etanol y la L-treonina. Se utilizó L-treonina en una concentración final de 100 mM como fuente de carbono para inducir el promotor *alcA(p)* (Lockington et al., 1985). Las cepas se incubaron previamente con glucosa durante 14 horas; acto seguido se filtró y trasladó el micelio a un medio fresco con L-treonina como fuente de carbono y se dejó incubando a 37 °C durante los periodos de tiempo deseados.

8.6. Sustitución de las regiones de *fluG* por homólogos bacterianos y de planta

Las cepas que contenían tanto los homólogos bacterianos y de planta del gen *fluG* se generaron a partir de oligonucleótidos que contenían las colas adecuadas para fusionar los genes candidatos (Tabla 2). Se diseñaron distintas variedades de casetes dependiendo de si se quería sustituir el gen *fluG* en su totalidad o solo la región N-terminal o C-terminal.

8.6.1. Sustitución del gen *fluG*

Los casetes que se diseñaron para la sustitución completa del gen *fluG*, se construyeron amplificando mediante PCR. Por un lado, se amplificaron los fragmentos correspondientes a la región 5'-UTR y la región 3'-UTR de *fluG*. Por otro, se amplificó el gen bacteriano o de planta a insertar en lugar del gen *fluG*, empleando oligonucleótidos con colas complementarias al extremo 3' del promotor y al extremo 5' del terminador que fueron amplificados previamente. Una vez obtenidos los tres fragmentos, se fusionaron mediante PCR de fusión o Touchdown PCR, quedando el gen bacteriano o de planta entre los fragmentos correspondientes al promotor y terminador (Figura 10).

8.6.2. Sustitución de la región C-terminal de *fluG*

El casete que se diseñó para la sustitución de la región C-terminal del gen *fluG*, se construyó amplificando mediante PCR dos fragmentos en el que uno contenía la región 5'-UTR y la región N-terminal con el 'linker' (conector sin otra función reconocida) del gen *fluG*, y el segundo contenía la región 3'-UTR de *fluG*. Por otro lado, se amplificó el gen bacteriano a insertar en lugar de la región C-terminal de *fluG*, empleando oligonucleótidos con colas complementarias al extremo 3' del 'linker' y al extremo 5' del terminador que fueron amplificados previamente. Una vez obtenidos los tres fragmentos, se fusionaron mediante PCR de fusión o Touchdown PCR, quedando el gen bacteriano entre los dos fragmentos (Figura 10).

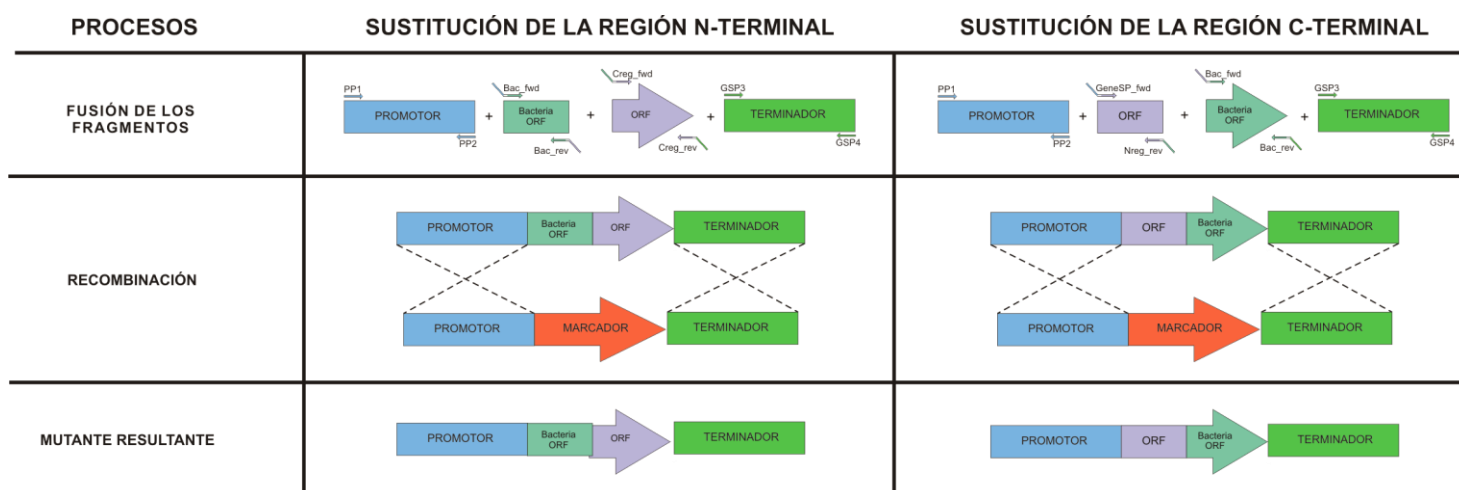


Figura 10. Primero, se amplificaron el promotor (azul), la región de FluG que se quiere conservar (morado), el gen bacteriano de interés (verde azulado) y el terminador (verde). Acto seguido, los fragmentos se fusionaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PP1 y GSP4. Los fragmentos que contenían las mutaciones puntuales transformado en una cepa *AfluG::pyrG^{Af}*, dándose la recombinación en el locus *pyrG* (naranja). La correcta integración se confirmó mediante Southern-blot.

9. Técnicas de análisis de expresión génica

9.1. Extracción y cuantificación del ARN total

Las muestras cultivadas en el MMA descrito en el 4. Medios y condiciones de cultivo de *Aspergillus nidulans* fueron filtradas a través de Miracloth (Calbiochem[®], $d_p = 22-25 \mu\text{m}$) estéril e inminentemente prensadas dentro de criotubos y congeladas en nitrógeno líquido. Acto seguido, se procedió a moler el micelio en mortero con nitrógeno líquido, evitando en todo momento que las muestras se descongelaran. Se transfirieron aproximadamente 100 mg de micelio triturado a un tubo Eppendorf de 2 mL y se procedió a extraer el ARN total empleando el kit NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co). Finalizada la extracción, se verificó el estado del ARN realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (p/v), para verificar que no se hubiera degradado. Finalmente, se procedió a medir la concentración y la pureza del ARN presente en la muestra utilizando el espectrofotómetro NanoDrop[™] 2000c (Thermo Fisher Scientific).

9.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el kit PrimeScript[™] RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.) siguiendo el protocolo de transcripción reversa facilitado por el fabricante.

9.3. Real-Time PCR (PCR a tiempo real)

La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando la máquina 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Corporation). Para preparación de la reacción se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos, en las que se vertieron 4 μL de la mezcla PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (CMB, Cultek Molecular Bioline), 0,5 μL de ambos primers, 5 μL de cDNA de interés y 10 μL de agua, hasta hacer una mezcla total de 20 μL . Una vez preparadas todas las muestras en sus correspondientes pocillos, se selló la microplaca con un film protector y se centrifugó para asegurar de que la mezcla se encontraba en la base del pocillo. Finalmente, se procedió a insertar la microplaca en la máquina y se programó según las instrucciones del fabricante para llevar a cabo la PCR cuantitativa utilizando el indicador EvaGreen.

10. Técnicas de biología molecular para *Escherichia coli*

10.1. Medios de cultivo y condiciones para *E. coli*

El medio de cultivo utilizado para *Escherichia coli* fue LB (Bertani, 1951) modificado (Sambrook et al., 1989). La composición está descrita en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición de medios de cultivo de *E.coli*

Medios de cultivo	Cantidades por litro	
LB líquido	Bactotripton (1 %)	10 g
	Extracto de levadura (0,5 %)	5 g
	NaCl (1 %)	10 g
	Ajustar el pH a 7 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
LB sólido	Bactotripton (1 %)	10 g
	Extracto de levadura (0,5 %)	5 g
	NaCl (1 %)	10 g
	Agar (1,5 %)	15 g
	Ajustar el pH a 7 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	

La selección de transformantes se hizo en un medio que contenía el antibiótico ampicilina (50 mg/mL en agua) con una concentración de 100 µg/mL.

10.2. Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo mediante la técnica de choque térmico (Hanahan, 1983). Todo el proceso se llevó a cabo en un tubo de 1,5 mL, en el que se añadieron 100 µL de células competentes de las cepas DH1 o DH5α y 1-2 µL de ADN plasmídico. Se dejó reposar la mezcla en hielo durante 20 minutos, y acto seguido se indujo en choque térmico incubando la mezcla a 42 °C durante 2 minutos y se dejó otra vez en hielo durante 1 minuto. A continuación, se añadió 1 mL de medio LB líquido y se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación a 250 rpm. Finalizado el periodo de incubación, se inocularon entre 50 y 100 µL de la mezcla de transformación en placas de Petri de 90 mm que contenían medio LB sólido suplementado con ampicilina. En el caso de las ligaciones, se centrifugó la mezcla a 2500 rpm durante 3 minutos, se retiraron 900 µL de sobrenadante y se concentró la mezcla de transformación en los 200 µL de

sobrenadante restantes para posteriormente inocularlo en placas suplementadas con ampicilina.

10.3. Extracción de ADN plasmídico

10.3.1. Extracción de ADN plasmídico a partir de colonias

Este método de extracción se utilizó para confirmar si las colonias transformantes contenían el plásmido de interés. La composición de las soluciones utilizadas para extraer ADN plasmídico de medio sólido está detallada en la Tabla 10.

Tabla 10. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN plasmídico en medio sólido

Soluciones	Cantidades por 10 mL	
Solución de lisis	Tris-HCl 1 M (pH 8)	100 μ l
	EDTA 0,5 M (pH 8)	200 μ l
	NaOH 10 M	100 μ l
	SDS (10 %)	1000 μ l
GLB	Glicerol	500 μ l
	Xileno-cianol	2,5 μ l
	Azul de bromofenol	2,5 μ l
HCl 1 N + GLB	HCl 1 N	3,34 mL
	GLB	6,66 mL

Para empezar, se añadieron 40 μ l de solución de lisis en un tubo de 1,5 mL. Se tomó una muestra de la colonia transformante con un palillo estéril y se frotó repetidamente contra la pared del tubo hasta que se depositó visiblemente la biomasa. Acto seguido, se mojó el palillo en la solución de lisis removiendo la mezcla y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras ello, se añadieron 8 μ l de la solución HCl (1 N) + GLB y se observó un color verde oscuro en la disolución. Se añadió la cantidad necesaria de solución de lisis hasta que la mezcla adquirió un color azul y se congeló la mezcla a -80 °C durante 15 minutos. Finalizado este tiempo, se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se utilizaron 20 μ l de sobrenadante para hacer una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v).

10.3.2. Extracción de ADN plasmídico de cultivo líquido

Este método de extracción se utilizó para purificar el plásmido de interés de las colonias transformantes que se habían confirmado con el método de extracción de ADN plasmídico de medio sólido. La extracción del ADN plasmídico se efectuó inoculando primero una alícuota de la colonia bacteriana a analizar en 25 mL de medio LB líquido

suplementado con ampicilina. Se cultivó la mezcla a 37 °C durante toda la noche con una agitación de 200 rpm. La extracción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich). Finalizada la extracción, se verificó la correcta extracción del ADN plasmídico, realizando una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v).

10.4. Digestión y ligación de plásmidos y fragmentos de ADN

Tanto el plásmido pNT5 como los distintos fragmentos se digirieron por separado con las enzimas *AscI* (New England BioLabs®) y *BamHI* (Takara Bio Inc.) utilizando el protocolo de digestión facilitado por el fabricante. La digestión con ambas enzimas se efectuó a 37 °C durante al menos 1 hora y 30 minutos, y se comprobó que la digestión se completó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v). Tras confirmar la correcta digestión, se inactivó la enzima a a 80 °C durante 20 minutos y se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel GmbH & Co), para retirar cualquier reactivo que pudiera causar interferencias en la segunda digestión.

Una vez finalizadas ambas digestiones, se procedió a medir la concentración en µg/µl del plásmido y el fragmento utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific), y se calculó la concentración de ambos en picomoles, valiéndonos de la herramienta digital DNA µg & pmol Converter (Gene Infinity LLC). La ecuación utilizada por la herramienta, es la siguiente:

$$\mu g \text{ de DNA} \cdot \frac{pmol}{660pg} \cdot \frac{10^6pg}{1\mu g} \cdot \frac{1}{n^\circ \text{ de nucleótidos}} = pmol \text{ de DNA}$$

Tras obtener las concentraciones, se procedió a preparar la ligación añadiendo tanto el plásmido como el fragmento en una relación 1:3, respectivamente. La ligación se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Takara Bio Inc.) siguiendo el protocolo de ligación facilitado por el fabricante. La ligación se efectuó a temperatura ambiente durante al menos 4 horas, y se transformó todo el producto de ligación en *E. coli* utilizando el protocolo descrito anteriormente (7.2. Transformación de protoplastos).

11. Técnicas de biología molecular para *Lactobacillus paracasei* y *Pseudomonas aeruginosa*

11.1. Medios de cultivo y condiciones para *L. paracasei* y *P. aeruginosa*

La composición de los medios de cultivo utilizados tanto para *Lactobacillus paracasei* (De Man et al., 1960) y *Pseudomonas aeruginosa* (Lapage et al., 1970) están descritos en la Tabla 11 y Tabla 12, respectivamente.

Tabla 11. Composición de los medios de cultivo utilizados en *Lactobacillus paracasei*

Medios de cultivo	Cantidades por litro	
MRS líquido	D(+)-glucosa	20 g
	Peptona	10 g
	Extracto de carne	10 g
	Extracto de levadura	5 g
	NaOAc	5 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
	Tartrato amónico	2 g
	Tween 80 %	1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05 g
	Ajustar el pH a 6,2 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	
	MRS sólido	D(+)-glucosa
Peptona		10 g
Extracto de carne		10 g
Extracto de levadura		5 g
NaOAc		5 g
K ₂ HPO ₄		2 g
Tartrato amónico		2 g
Tween 80 %		1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O		0,05 g
Agar		15 g
Ajustar el pH a 6,2 (con NaOH)		
Esterilizar en autoclave		

Tabla 12. Composición de los medios de cultivo utilizados en *Pseudomonas aeruginosa*

Medios de cultivo	Cantidades por litro	
Medio de nutrientes líquido	Tris HCl	5 g
	Extracto de levadura	2 g
	Extracto de carne	1 g
	NaCl	5 g
	Ajustar el pH a 7,2 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	

Medio de nutrientes sólido	Peptona	5 g
	Extracto de levadura	2 g
	Extracto de carne	1 g
	NaCl	5 g
	Agar (1,5 %)	15 g
	Ajustar el pH a 7,2 (con NaOH)	
	Esterilizar en autoclave	

11.2. Extracción de ADN genómico en bacteria

11.2.1. Extracción de ADN genómico de *Lactobacillus paracasei*

Este método de extracción se utilizó para purificar el material genético de *L. paracasei* (Klaenhammer, 1984), la preparación de las soluciones utilizadas está descrita en la Tabla 13.

Tabla 13. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN de *Lactobacillus paracasei*

Preparación de soluciones	Cantidades por litro	
Solución de lisis	Tris-HCl 1 M (pH 8)	20 mL
	Tween 20 %	12 mL
	EDTA 0,5 M (pH 8)	4 mL
	20 g de Lisozima (Sigma-Aldrich)	
	Guardar a -20 °C	

La extracción se efectuó inoculando primero una alícuota de la colonia bacteriana en 25 mL de medio MRS líquido. Se cultivó la mezcla a 37 °C durante toda la noche con una agitación de 200 rpm. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 180 µL de solución de lisis y 20 µL de mutanolisina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich), dejando incubar la mezcla durante 1 hora con agitación a 200 rpm. Acto seguido, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico siguiendo las indicaciones del kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co). Finalizada la extracción, se verificó el estado del ADN genómico realizando una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v).

11.2.2. Extracción de ADN genómico de *Pseudomonas aeruginosa*

La extracción de ADN genómico de *P. aeruginosa* se efectuó utilizando un kit de extracción de ADN genómico de bacterias. Primero se inoculó una alícuota de la colonia bacteriana en 25 mL de medio de nutrientes líquido. Se cultivó la mezcla a 37 °C durante toda la noche con una agitación de 200 rpm. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y se llevó a cabo la extracción de ADN genómico siguiendo las indicaciones del kit

NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co). Finalizada la extracción, se verificó el estado del ADN genómico realizando una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v).

12. Aislamiento y manipulación de proteínas en *Aspergillus nidulans*

12.1. Extracción de proteínas

Tabla 14. Soluciones utilizadas para la extracción de proteínas de *Aspergillus nidulans*

Soluciones	Cantidades por 100 mL	
Solución de lisis	NaOH 10 M	1 mL
	β-mercaptoetanol	100 μL
	Guardar a 0 °C	
TCA 100 %	TCA	220,26 g
	Cubrir la botella con papel de aluminio	
	Guardar a 4 °C	
Tris Base 1 M	Trizma®	12,114 g
	Guardar a 4 °C	
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	Trizma®	6,057 g
	Ajustar el pH a 6,8 (con HCl)	
SDS 10 %	SDS	10 g
Tampón de ruptura	Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,66 mL
	SDS 10 %	2 mL
	β-mercaptoetanol	500 μL
	Urea	3,6 g
	Guardar a -20 °C	

La extracción de proteínas se llevó a cabo mediante el método descrito por (Hervás-Aguilar y Peñalva, 2010). Se inocularon $2 \cdot 10^6$ conidias/mL de cada cepa en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio líquido junto con los suplementos necesarios y se cultivó el inóculo a 37 °C durante 18 horas en agitación (220 rpm). El micelio se filtró a través de Miracloth estéril, se introdujo en tubos cónicos de 2 mL y se liofilizó (Cryodos, Telstar®) toda la noche. Una vez recogido el micelio liofilizado, se añadió una bola de acero inoxidable y se pulverizó el micelio liofilizado con el homogeneizador (Mini-Beadbeater, Biospec) en dos pulsos de 5 segundos con agitación mediana. Acto seguido se recogieron 6-7 mg de micelio pulverizado en un nuevo tubo de 2 mL y se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis Tabla 14. Se disolvió el micelio mezclando el tubo vigorosamente en el vortex, se añadió 75 μL de TCA 100 % (p/v) para precipitar las proteínas y se incubó la mezcla durante 10 minutos en hielo. Finalizada la incubación, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se eliminó el TCA mediante aspiración. Se repitió este paso

para retirar el TCA residual. Seguidamente, se añadieron 100 μ L de Tris Base (1 M) y 200 μ L de tampón de ruptura, se mezcló mediante agitación por vortex y se guardó la muestra a -20 °C. Previamente a ser cargadas en un gel de SDS-poliacrilamida, se descongelaron las muestras en hielo y se agitaron en vortex durante 30 segundos. Acto seguido, se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugaron durante 1 minuto a velocidad máxima.

12.2. Western blot

Los extractos proteicos fueron cargados en un gel SDS-poliacrilamida para realizar la separación de los mismos (Sambrook et al., 1989). Una vez se desnaturalizaron las muestras con las condiciones descritas previamente, se cargaron en dos geles con una concentración de poliácridamida del 10 % (Mini-PROTEAN[®] 3, Bio-Rad) (Laemmli, 1970). La integridad de los extractos proteicos se analizó tiñendo uno de los geles con Bio-Safe[™] Coomassie. Una vez confirmado el correcto estado de los extractos proteicos, se procedió a la transferencia del segundo gel a una membrana de PVDF (Trans-blot[®] Turbo[™] Midi PVDF Transfer Pack, Bio-Rad). Para comprobar que la cantidad de proteína fuera la misma en todas las muestras, se empleó el método Ponceau Staining (Goldman et al., 2016). Una vez hecha la comprobación, los epítomos correspondientes se detectaron mediante la hibridación con anticuerpos primarios específicos, y estos anticuerpos primarios se hibridaron con anticuerpos secundarios adecuados con actividad peroxidasa (Tabla 15).

Tabla 15. Anticuerpos utilizados en el Western blot

Anticuerpos		Dilución	Origen	Fabricante
Primario	α -GFP	1/5000	Ratón	Roche
	α -HA	1/7500	Ratón	Santa Cruz
Secundario	α -ratón IgG	1/4000	Cabra	Jackson ImmunoResearch Laboratories INC

Esta actividad se indujo mediante el kit de quimioluminiscencia ECL (Clarity[™] Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad) y la membrana se reveló con el dispositivo ChemiDoc[™] XRS+ System (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron mediante el software ImageLab (versión 5.2, Bio-Rad).

13. Herramientas de análisis bioinformático

El análisis bioinformático de la secuencia genómica y proteica de *fluG* se llevó a cabo empleando las herramientas citadas a continuación.

13.1. Construcción y secuenciación

Las distintas secuencias analizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de las bases de datos Aspergillus Genome Database (www.aspgd.org/) (Cerqueira et al., 2014) y Ensembl Genomes (www.ensemblgenomes.org/) (Kersey et al., 2018). Las construcciones genómicas y plasmídicas se diseñaron utilizando el programa Vector NTI® versión 10.1.1 (Invitrogen). Los resultados obtenidos de la secuenciación de distintos mutantes se compararon con la secuencia original del gen utilizando la herramienta Lalign (www.embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html), la cual implementa un algoritmo (Huang et al., 1990).

13.2. Análisis *in silico* de FluG

La secuencia proteica de FluG se analizó utilizando una serie de predictores específicos para los dominios que se detallan a continuación: El péptido señal, el cual señala el destino, la ruta de transporte y la eficiencia de secreción de una proteína, se predijo mediante la herramienta SignalIP 4.1 (Nielsen, 2017). Las señales de localización y exportación nuclear, que habilitan el transporte por el poro nuclear, se predijeron mediante las herramientas NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009) y NetNES 1.1 (la Cour et al., 2004), respectivamente. La presencia de hélices transmembrana, las cuales pueden indicar, según su conformación que la proteína interactúa con la membrana celular, se predijeron utilizando la herramienta TMHMM server v2 (Sonnhammer et al., 1998). Finalmente, los motivos PEST, los cuales son candidatos a ser cortados mediante proteólisis, se predijeron utilizando la herramienta epestfind (Rechsteiner y Rogers, 1996). La identificación de los motivos funcionales se llevó a cabo utilizando la herramienta HMMER (www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer).

13.3. Búsqueda de homólogos de FluG en bacterias y plantas

Utilizando la secuencia proteica de FluG como referencia, se buscaron ortólogos en bacterias, hongos y plantas realizando un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) en el

apartado Protein Blast (Boratyn et al., 2013). Se utilizó el algoritmo BLOSUM26 como matriz de referencia, fijando el límite de evaluación del alineamiento (E-valor) en $2e^{-100}$. Una vez obtenidos los ortólogos, se procedió a hacer un alineamiento múltiple de todas las secuencias utilizando la herramienta Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) facilitado por EBI (European Bioinformatics Institute) (Li et al., 2015). Los alineamientos se visualizaron utilizando el programa Jalview versión 2.10.3b1 (Waterhouse et al., 2009), y la conservación de cada residuo de todos los homólogos obtenidos se obtuvo utilizando el algoritmo de divergencia Jensen-Shannon (Capra y Singh, 2007). El valor de la identidad de todos los ortólogos de FluG se obtuvo como una media de las identidades de todas las identidades de los ortólogos de FluG en bacteria, hongo y planta, en comparación con el FluG de *Aspergillus nidulans*. La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo utilizando el software MEGA7 (Kumar et al., 2016) y aplicando el método basado en la mínima evolución (Neighbor-Joining Method) (Saitou y Nei, 1987). Los resultados fueron posteriormente editados utilizando la herramienta iTOL (Interactive Tree Of Life) (Letunic y Bork, 2019). La búsqueda de operones predichos en bacteria que codificaran ambas regiones de FluG se llevó a cabo mediante los predictores OperonDB (Perlea et al., 2009) y ProOpDB (Taboada et al., 2012).

13.4. Búsqueda de estructuras de cristal mediante SWISS-MODEL

Utilizando la secuencia proteica de FluG como referencia, se utilizó la herramienta SWISS-MODEL (www.swissmodel.expasy.org/) (Biasini et al., 2014) para identificar estructuras de cristal homólogas a ambas regiones de FluG. Tras haber obtenido varias estructuras candidatas a servir como modelos de FluG, previamente a ser utilizadas, se verificó si se había caracterizado la reacción enzimática que desempeñaban. Las estructuras de cristal de cada región de FluG fueron obtenidas de Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2002).

13.5. Modelado de FluG mediante MAESTRO

El modelado de FluG se llevó a cabo utilizando el programa MAESTRO, proporcionado por Schrödinger Suite, versión 2017-1 (Sastry et al., 2013). Primero, se llevó a cabo un preprocesado de la estructura de cristal candidata a ser utilizada como molde. Para ello, dentro del programa MAESTRO, se utilizó la aplicación Protein

Preparation Wizard para eliminar moléculas de agua, añadir los átomos de hidrógeno y detectar problemas estructurales del modelo. Las cadenas laterales de aminoácidos que faltaban en el modelo, se generaron utilizando la aplicación Prime (Jacobson et al., 2004), mientras que los estados de protonación de cada cadena lateral fueron generados utilizando la herramienta EPIK a pH = 7 (Shelley et al., 2007). Acto seguido, se procedió a la minimización del modelo utilizando el campo de fuerza OPLS3 (Shivakumar et al., 2010; Harder et al., 2016). Una vez finalizado el procesado de los cristales, se procedió a construir los modelos de FluG con las estructuras de cristal tratadas, utilizando el programa Prime. El alineamiento utilizado para la generación de los modelos de cada región de FluG fue el obtenido por la herramienta SWISS-MODEL.

14. Microscopía de fluorescencia

La localización subcelular de FluG en *Aspergillus nidulans* se analizó utilizando el microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1 equipado con una lente de inmersión en aceite (63x, Plan Apochromat), una cámara AxioCam MRm Rev.3, una fuente de luz externa Zeiss HXP 120C para los experimentos de epifluorescencia y los filtros verde (filtro 38 HE, excitación 470/40; emisión 525/50), rojo (filtro 43 HE, excitación 545/25; emisión 605/70) y DAPI (filtro 49; excitación 365 nm; emisión 445 nm).

El análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio se realizó mediante el software de libre acceso Fiji versión 2.0.0-rc-54/1.51g (www.fiji.sc/) (Schindelin et al., 2012).

**CAPÍTULO III: PRIMERA APROXIMACIÓN
A LA FUNCIÓN DE *fluG***

1. Introducción

Una característica común de los hongos filamentosos, incluido el género *Aspergillus*, es su capacidad para producir metabolitos secundarios. A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento celular, pero proporcionan una ventaja competitiva como agentes protectores o moléculas señalizadoras tanto en hongos como en bacterias y plantas (Demain y Fang, 2000). Los metabolitos secundarios se pueden dividir en cuatro grupos: policétidos, terpenoides, compuestos derivados del ácido shikímico y péptidos no-ribosómicos. Por otro lado, la combinación de estos grupos da lugar a una gran variedad de metabolitos híbridos como en los meroterpenoides, entre policétidos y terpenos, aumentan significativamente la complejidad y la diversidad del metabolismo en los hongos (Klejnstrup et al., 2012). Tal y como se ha mencionado en la introducción general, la búsqueda y caracterización funcional de metabolitos secundarios sigue siendo hoy en día objeto fundamental de líneas de investigación centradas en la búsqueda de compuestos bioactivos que muestren actividad antimicrobiana y antitumoral (Nielsen y Smedsgaard, 2003; Keller et al., 2005; Kjaerbolling et al., 2019).

Estudios basados en la delección de librerías de genes que codifican policétidos han desvelado los genes responsables de la síntesis de varios metabolitos secundarios. En el estudio llevado a cabo por Nielsen et al. (2011), se construyeron mutantes deficientes en la producción de policétidos, que no mostraban defectos en la esporulación. Entre ellos, se encontraba el mutante del gen *ausA* (AN8383), necesario para sintetizar un policétido (Ahuja et al., 2012) que actúa como precursor del 3,5-dimetilorselínico (3,5-DMO). Este compuesto forma el primer intermediario para sintetizar el dehidroaustinol (DHA) (Lo et al., 2012; Matsuda et al., 2013).

Un estudio llevado a cabo por Rodríguez-Urra et al. (2012) desveló que en ausencia del gen *fluG*, no se sintetizaba el DHA. Por otro lado, se confirmó que la adición de un aducto formado por diorcinol y DHA era capaz de inducir la esporulación parcial en una cepa *AfluG*. Teniendo en cuenta que Nielsen et al. (2011) mencionó que un mutante Δ *ausA* mostraba un fenotipo esporulante, el resultado de Rodríguez-Urra et al. (2012) solo podría explicarse si DHA fuese un inductor de la esporulación que actuase de manera paralela a la señal de FluG.

Las primeras aproximaciones en torno a la distribución intracelular de FluG (Lee y Adams, 1994) mostraron mediante un experimento de separación de organelas que FluG estaba localizado mayormente en el citoplasma. No obstante, estudios recientes llevados a cabo en *Aspergillus flavus* sugerían mediante un análisis Yeast-two-Hybrid que FluG formaba parte del complejo trimérico VelB-VeA-LaeA (Chang et al., 2013), el cual se forma dentro del núcleo (Bayram et al., 2008). Con respecto a la localización de FluG, se han publicado observaciones divergentes. En lo que a la localización de FluG respecta, las primeras aproximaciones en este campo mostraron mediante un experimento de fraccionamiento celular que FluG estaba localizado mayormente en el citoplasma (Lee y Adams, 1994). No obstante, estudios llevados a cabo en *Aspergillus flavus* sugirieron mediante un análisis Yeast-two-Hybrid que FluG formaba parte del complejo trimérico VelB-VeA-LaeA (Chang et al., 2013), el cual se forma dentro del núcleo (Bayram et al., 2008). Por otro lado, estudios centrados en la caracterización de los genes que participan en la inducción de la conidiación en *Aspergillus nidulans*, han desvelado que estos factores exhiben un patrón de localización muy específico en la hifa. Algunos factores se localizan en el compartimento nuclear (*flbC* y *flbD*), mientras que otros factores se encuentran tanto en la punta de la hifa (*flbE*) como en el núcleo (*flbB*) (Etxebeste et al., 2010a). Teniendo en cuenta que los antecedentes citados anteriormente proponen localizaciones diferentes, se decidió investigar la localización de FluG *in vivo* mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.

En este capítulo se aclaran los aspectos relacionados con el DHA como el factor de FluG y si el gen *ausA* forma parte de la ruta de inducción de la conidiación de FluG, así como otros aspectos relacionados con la función de este factor, que no habían sido tratadas en anteriores investigaciones.

2. Resultados

2.1. La producción de conidias no se ve afectada en una cepa mutante *ΔausA*

Los estudios anteriores realizados por Nielsen et al. (2011) afirmaban que un nulo del gen *ausA*, que no produce DHA, exhibe un fenotipo esporulante. Por tanto, se decidió llevar a cabo una caracterización fenotípica de un mutante *ΔausA* en un fondo genético *veA1*, tal y como se ha efectuado en estudios anteriores.

Tal y como se muestra en la Figura 11A, no se observó ninguna diferencia fenotípica entre el crecimiento y desarrollo de la cepa silvestre (TN02A3) que se usó como parental y el mutante *ΔausA*. Una vez se llevó a cabo la caracterización fenotípica en MMA y MCA y el análisis estadístico de los resultados obtenido en ambas cepas, no se observó que hubiera diferencias significativas en el desarrollo asexual (Figura 11B). Estos resultados confirman las observaciones realizadas por Nielsen et al. (2011) y colaboradores.

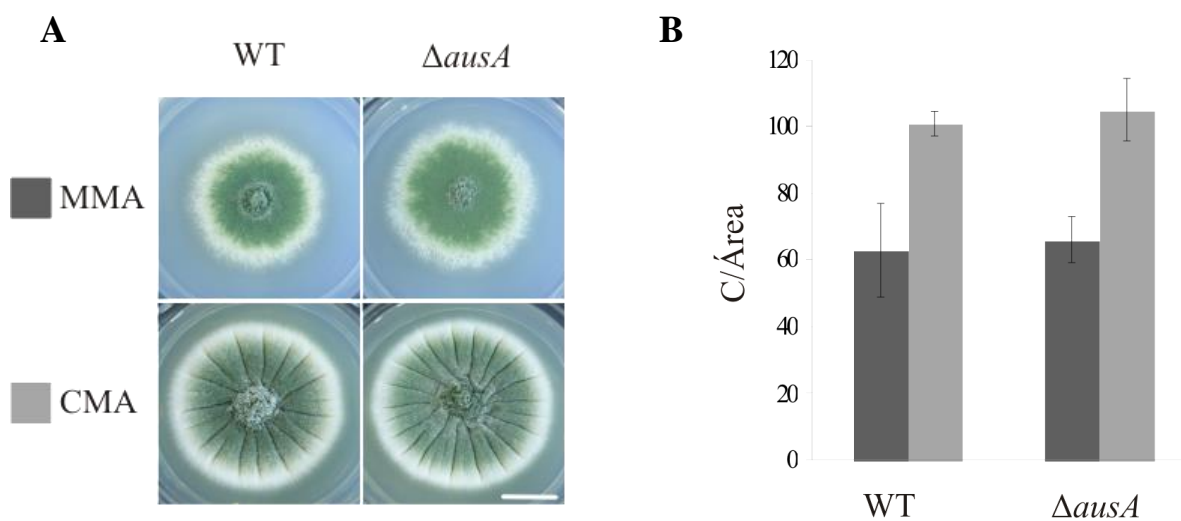


Figura 11. A) Fenotipos de la cepa silvestre (TN02A3) y la cepa *ΔausA* (BD688) en medio mínimo (MMA) y medio completo (MCA), tras haberlos incubado durante 72 h. Barra de escala = 1 cm. B) Gráficas representando la ratio de esporulación por centímetro cuadrado (C/Área) en MMA y MCA.

2.2. Una cepa *ΔausA* revierte el fenotipo aconidial de un mutante *cfwA2* y *ΔfluG*

Tras la observación llevada a cabo en el apartado anterior, se decidió llevar a cabo experimentos de contacto entre cepas (Lee y Adams, 1994) (Figura 12A), con el objetivo de verificar si un mutante *ΔausA* podría donar el factor FluG a una cepa receptora. Como cepas donantes del metabolito de FluG, se utilizaron una cepa silvestre y el mutante

$\Delta ausA$, mientras que como cepas receptoras de los metabolitos, se utilizó un mutante $\Delta fluG$ el cual no sintetiza ningún metabolito que esté aguas debajo de FluG, y la cepa *cfwA2*, la cual contiene una mutación en el gen *npgA* que codifica una 4-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) (Márquez-Fernández et al., 2007). Esta última cepa está afectada en la biosíntesis de la penicilina, la síntesis de pigmentos, la síntesis de lisina, la biosíntesis de sideróforos (Oberegger et al., 2003), así como en la síntesis de varios policétidos entre los que se encuentra el DHA. Curiosamente, tanto el crecimiento vegetativo y desarrollo asexual y sexual están afectados en el mutante *cfwA2*. Los defectos que manifiesta este mutante tanto en la producción de metabolitos como en el desarrollo del hongo, lo convirtieron en un candidato adecuado para el experimento de contacto, para analizar que cepas son capaces de complementar los defectos de distintos mutantes.

Los resultados de los primeros experimentos de contacto llevados a cabo utilizando como donantes una cepa silvestre y un mutante $\Delta ausA$ para transmitir el metabolito a la cepa aceptora $\Delta fluG$ se muestran en la Figura 12B. La formación de un frente de esporas amarillas perteneciente a la cepa $\Delta fluG$ confirma que un mutante $\Delta ausA$ puede inducir la esporulación de la misma forma que una cepa silvestre, lo cual indica que la molécula señalizadora de FluG está presente en esta cepa, que no produce DHA.

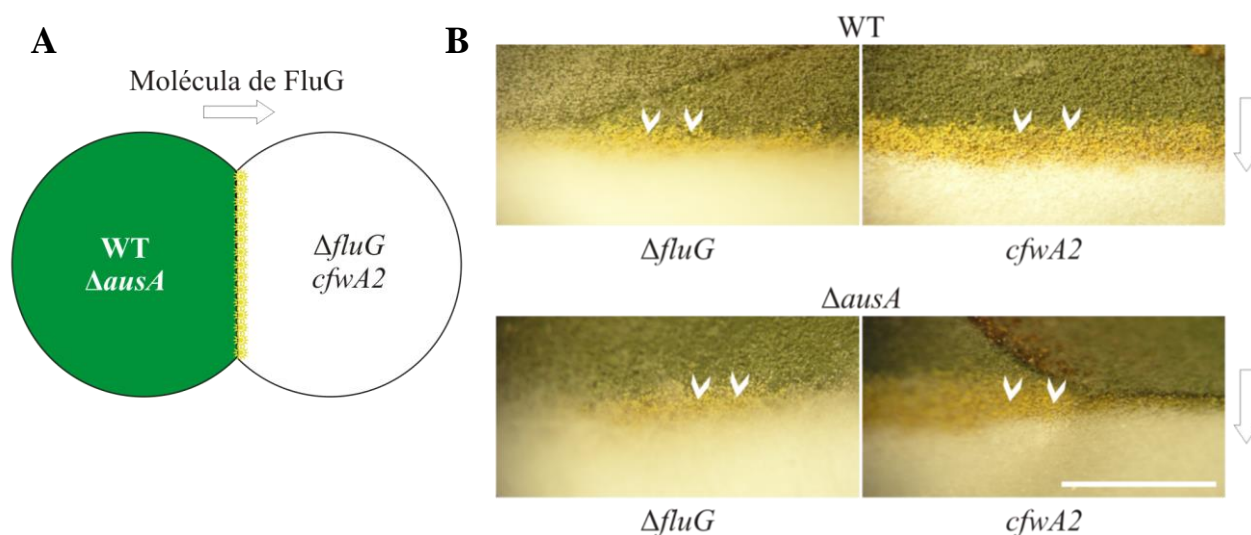


Figura 12. A) Esquema del experimento de contacto y transmisión de la molécula inductora de la esporulación. La zona de contacto entre las dos cepas se muestra en amarillo, debido a que la cepa receptora es capaz de desarrollar esporas B) Representación de los experimentos de contacto entre una cepa esporulante (WT y $\Delta ausA$) y una cepa *fluffy* ($\Delta fluG$ y *cfwA2*). Las zonas de contacto en las que se han desarrollado las esporas amarillas pertenecientes a las cepas *fluffy*, están indicadas con flechas blancas. Barra de escala = 5 mm

Por otro lado, los resultados obtenidos de un segundo experimento de contacto mostrado en la figura del Anexo 1 confirman que tanto la cepa silvestre, como la cepa $\Delta fluG$ y la $\Delta ausA$ transmiten el metabolito a la cepa *cfwA2*, debido a que en la zona de contacto se han desarrollado conidióforos de color amarillo pertenecientes a esta cepa. Esta cuestión se trata más a fondo en el Anexo 1.

2.3. La delección del gen *fluG* afecta tanto al desarrollo asexual, como al sexual en *Aspergillus nidulans*

Estudios anteriores se centraron en el efecto de FluG sobre el desarrollo asexual (Lee y Adams, 1994; Yager et al., 1998; D'Souza et al., 2001) sin aportar datos sobre la formación de cleistotecios. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en *Aspergillus flavus* sobre la caracterización de un mutante $\Delta fluG$, desveló que este mutante está afectado principalmente en el desarrollo sexual (Chang et al., 2012). Resultados posteriores aportaron evidencia que FluG actúa con el complejo Velvet, formado por los reguladores del desarrollo y metabolismo secundario VeA, VelB y LaeA (Chang et al., 2013). Teniendo en cuenta estos datos, se decidió explorar el papel de FluG en el desarrollo sexual de *A. nidulans*, llevando a cabo un conteo de cleistotecios en una cepa silvestre y un nulo del gen *fluG* (Figura 13).

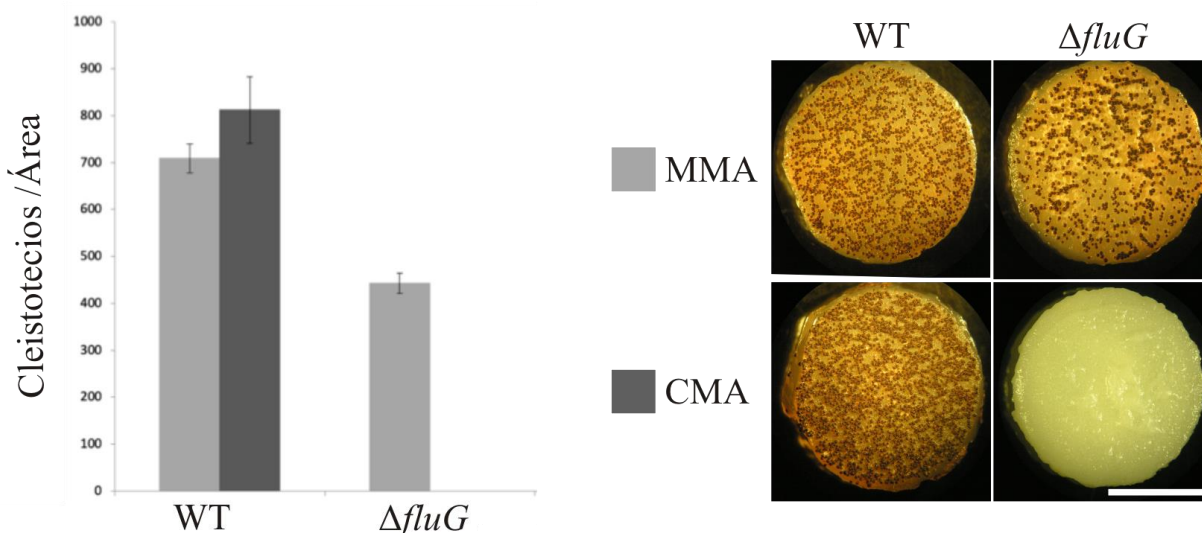


Figura 13. Contaje de cleistotecios (estructuras circulares, melanizadas con un color oscuro) en una cepa WT y $\Delta fluG$ (Izquierda), junto con los discos en los que reflejan los fenotipos obtenidos en MMA y CMA (Derecha). Barra de escala = 0,5 cm

Los resultados (Figura 13) muestran que en medio mínimo la producción de cleistotecios por unidad de área (cm²) en una cepa Δ *fluG* se ve reducida en un 46%, mientras que, en medio completo, no se desarrolla ninguna estructura sexual. Estos resultados demuestran claramente que FluG es necesario en el desarrollo asexual y sexual de *Aspergillus nidulans*, especialmente en un medio rico en nutrientes.

2.4. FluG presenta una distribución homogénea en el citoplasma

Ante la divergencia de resultados citados anteriormente, se decidió investigar la localización de FluG *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia.

El estudio de la localización de FluG se llevó a cabo etiquetando la proteína fluorescente GFP (PM ~ 27 kDa), la cual emite fluorescencia de color verde. La proteína GFP se etiquetó en los extremos N- y C-terminal y se comprobó si el etiquetado tenía algún efecto en la función de la proteína. Se utilizó la misma aproximación para etiquetar a FluG con el epítipo no fluorescente 3xHA, el cual es menos voluminoso que GFP (PM ~ 3 kDa) y facilita el estudio de las proteínas. Por otro lado, teniendo en cuenta que estudios anteriores comprobaron que FluG tiene una baja expresión basal durante las etapas del crecimiento y desarrollo asexual del hongo (Lee y Adams, 1994; Etxebeste et al., 2010a), se sustituyó el promotor nativo por el promotor inducible *alcA*, el cual se induce en presencia de alcohol o treonina (Sealy-Lewis y Lockington, 1984). Una vez obtenidas todas las cepas etiquetadas de FluG (Figura 14), se observó que las cepas etiquetadas en el extremo C-terminal exhibían un fenotipo *fluffy*, semejante al observado

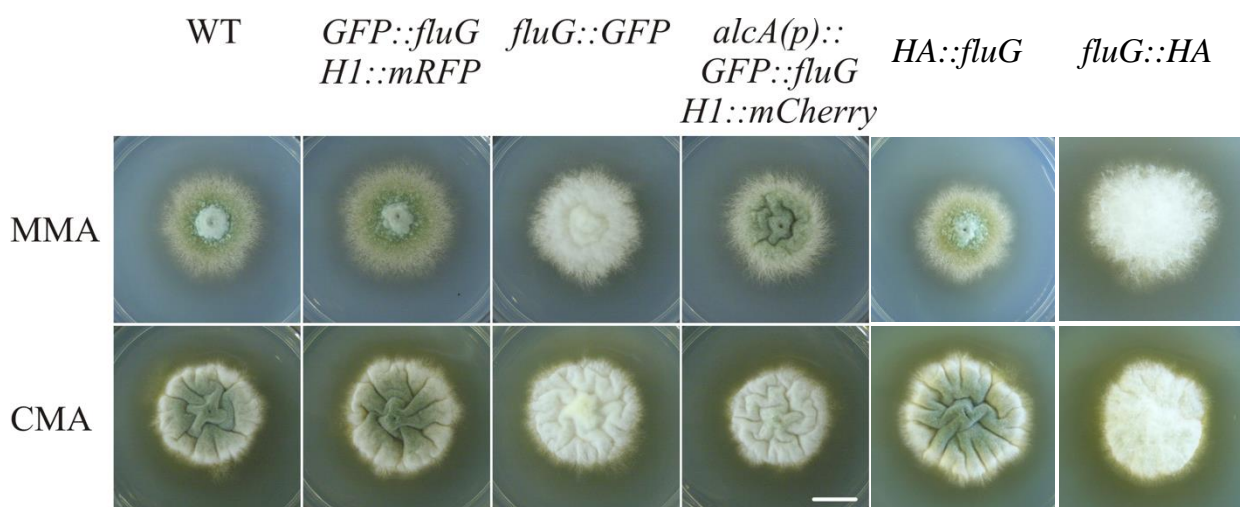


Figura 14. Fenotipos de los mutantes etiquetados con los epítipos GFP y HA_{3x} en los extremos N- y C-terminal de FluG, tras haberlos incubado durante 72 h. Barra de escala = 1 cm

en una cepa *ΔfluG*. Este efecto se observó también con el epítipo HA_{3x}, lo cual indica que, el etiquetado afectaba drásticamente a la función. Se descartó este último etiquetado en los experimentos de microscopía.

Por otro lado, los etiquetados efectuados con ambas proteínas en el extremo N-terminal mostraron un fenotipo silvestre. La cepa con el etiquetado de GFP en el extremo N-terminal, era cultivada en un medio con glucosa (en el que el promotor no está activo), se observó un descenso significativo en la conidiación (Figura 15). Este resultado es coherente con la funcionalidad del promotor.

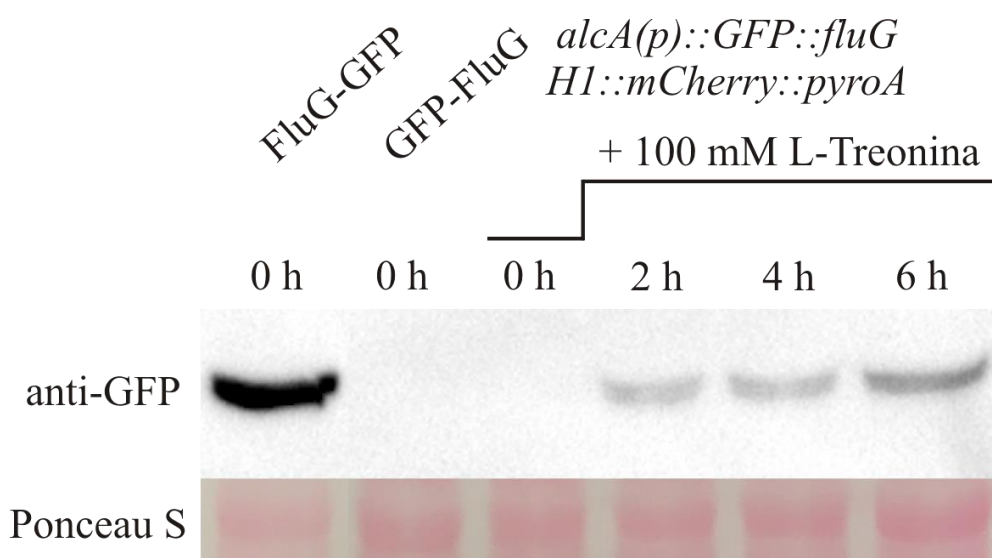


Figura 15. Detección de los etiquetados FluG-GFP y GFP-FluG y *alcA::GFP::FluG* mediante Western Blot.

En el caso de la cepa con promotor *alcA*, se analizó la expresión de la proteína después de cambiar la fuente de carbono a la treonina. La determinación del tiempo requerido para inducir la expresión de proteína etiquetada bajo el control del promotor *alcA*, se llevó a cabo monitorizando el patrón de expresión de la proteína FluG en las cepas etiquetadas en el extremo N- y C-terminal de con ambas proteínas, mediante Western blot (Figura 15 y Anexo 2).

Los resultados obtenidos en el experimento de detección de la proteína GFP muestran una banda de aproximadamente 124 kDa correspondiente al etiquetado de FluG con la proteína GFP en las cepas *alcA::GFP::fluG* y *fluG::GFP* (Figura 15). Por un lado, se observó que, después de haber inducido la expresión de *fluG* bajo el promotor *alcA* con treonina en la cepa *alcA::GFP::fluG*, el nivel de expresión de GFP-FluG aumentaba

con el tiempo, como se puede observar en los periodos de dos horas reflejados en la Figura 15. Sin embargo, no se pudo detectar la banda correspondiente a la proteína etiquetada en la cepa *GFP::fluG*.

Por otro lado, los resultados de detección del epítipo HA_{3x} (Anexo 2) muestran al menos una banda de aproximadamente 100 kDa en los etiquetados de ambos extremos N- y C-terminal, junto con otras bandas de menor tamaño, lo cual sugiere que la proteína FluG está siendo degradada. Cabe destacar que las dos cepas etiquetadas con ambas proteínas (GFP y HA_{3x}) en el extremo C-terminal, las cuales están expresadas bajo promotor nativo, mostraron una banda mucho más intensa a la misma altura en comparación con la observada en la cepa *HA_{3x}::fluG*. Teniendo en cuenta que en todos los experimentos se cargó la misma cantidad de proteína en el gel, este último resultado sugiere que la expresión de FluG se ve alterada al etiquetarla en el extremo C-terminal (en cuyo caso, parece que no se produce una forma funcional de la proteína, como se ha apuntado anteriormente).

Tras haber estudiado la detección de la proteína FluG en las cepas etiquetadas con HA_{3x} y GFP, se procedió a analizar la localización de las que tenían el etiquetado GFP mediante la técnica de microscopía de fluorescencia. Teniendo en cuenta los antecedentes que sugieren que FluG pueda tener una localización nuclear, la localización de los núcleos se llevó a cabo etiquetando la histona H1 con mRPF y mCherry en las cepas *GFP::fluG* y *alcA::GFP::fluG*, respectivamente. Estas proteínas emiten una fluorescencia de color rojo cuando son observadas mediante microscopía de fluorescencia. Dado que FluG está etiquetado con la una proteína que emite una fluorescencia verde, en el caso de que ambas proteínas se colocasen en el mismo compartimento celular, la fluorescencia que se observa durante la microscopía de fluorescencia sería de color amarillo.

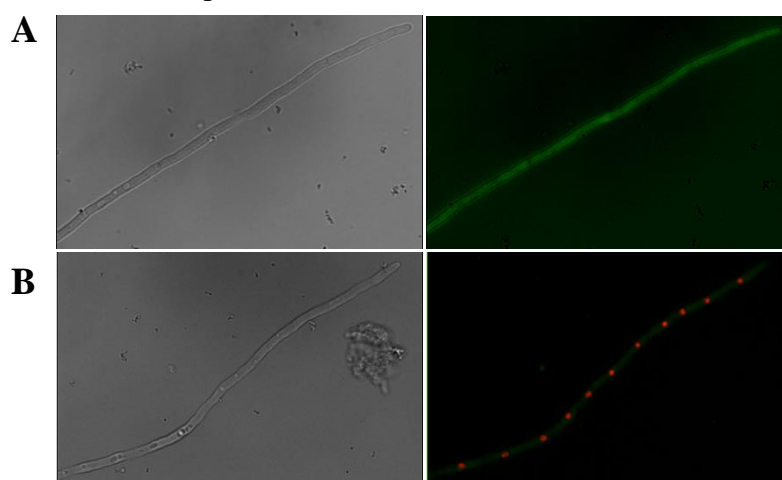


Figura 16. A) Resultados de fluorescencia obtenidos con la cepa *fluG::GFP*. B) Resultados de fluorescencia obtenidos con la cepa *GFP::fluG; H1::mRFP*. Barra de escala = 10 μ m

En acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos Western blot, la cepa *fluG::GFP*, emitía una señal de fluorescencia por todo el citoplasma (Figura 16A). En la cepa *GFP::fluG* expresada bajo promotor nativo, en cambio, no se detectó fluorescencia. (Figura 16B). En la cepa *alcA::GFP::fluG*, se monitorizó la localización de FluG después de haber inducido la expresión del promotor *alcA* con treonina durante 2 horas (Figura 17C). En esta última, a tiempo 0 horas no se detectó ninguna señal de fluorescencia, al igual que en la cepa *GFP::fluG* expresada bajo promotor nativo. Después de haber inducido la expresión de *alcA* con treonina durante 2 horas, se observó que GFP-FluG presentaba una distribución homogénea en el citoplasma de la hifa. La señal roja que emitían los núcleos confirma que GFP-FluG está mayormente ausente del compartimento nuclear, relegado principalmente al citoplasma. Por otro lado, la proteína parece estar ausente del lumen de las vacuolas (parte magnificada marcada con flechas blancas).

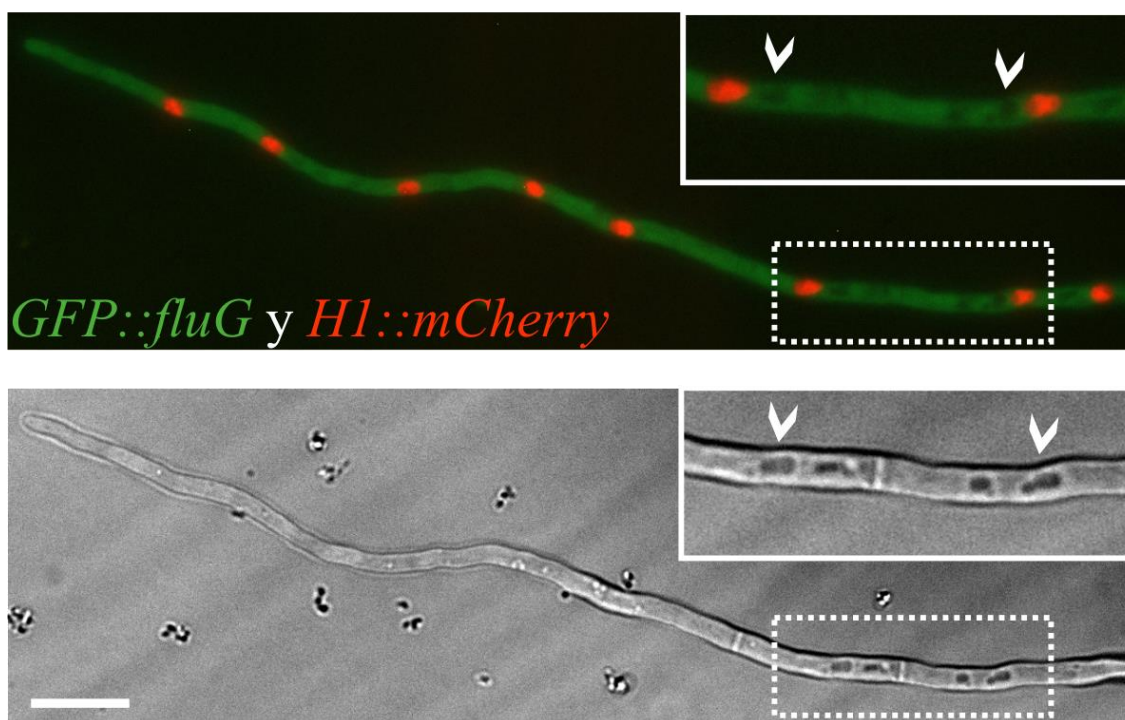


Figura 17. Resultados de fluorescencia obtenidos con la cepa *alcA::GFP::fluG; H1::mCherry*. La fluorescencia verde corresponde a la localización de FluG y la fluorescencia roja corresponde a la localización de los núcleos. Barra de escala = 10 μ m

Los resultados obtenidos en el experimento de microscopía indicaron que FluG está distribuido homogéneamente por todo el citoplasma de las células vegetativas.

3. Discusión

En este capítulo se ha abordado la relación de FluG con el DHA, el efecto que tiene la ausencia de FluG en el ciclo sexual y se ha verificado la localización que muestra *in vivo*.

En lo referente a la relación con el DHA, como ya postuló el estudio de Rodríguez-Urra et al. (2012), se confirma que el factor DHA no es el factor de FluG. Si bien este último estudio resaltó el papel del DHA como un metabolito secundario que induce la esporulación, estudios posteriores donde han analizado mutantes con un fenotipo altamente esporulante, han demostrado que estos mutantes tienen una alteración en el metabolismo secundario en el que destacan un aumento tanto en la expresión como la síntesis del DHA (Guerriero et al., 2017; Jain et al., 2018; Thieme et al., 2018).

Así como la caracterización fenotípica del mutante nulo del gen *ausA*, el cual no produce DHA, desveló que esta cepa mostraba niveles de esporulación semejantes a los observados en una cepa silvestre, los experimentos de contacto confirmaron que este mutante era capaz de revertir el fenotipo aconidial en la zona de contacto de las colonias adyacentes *ΔfluG* y *cfwA2*. Este resultado confirma que el DHA no está implicado directamente en la inducción de la esporulación llevada a cabo por FluG. Cabe resaltar que la complementación observada en una colonia *cfwA2* en contacto con una cepa *ΔfluG* sugiere que existen más metabolitos que inducen la esporulación, ya que una cepa *cfwA2* no produce DHA (Márquez-Fernández et al., 2007).

Por otro lado, el hecho de que una cepa *ΔfluG* fuera capaz de inducir la conidiación en la zona de contacto de una cepa *cfwA2* puede estar relacionado con el amplio papel que desarrolla este último gen. El estudio llevado a cabo por Kim et al. (2015) confirmaba que el fenotipo letal causado por una cepa nula en el gen *npgA* podía ser parcialmente revertido si al hongo se le añadía un concentrado filtrado de un WT, el cual contenía intermediarios del metabolismo, durante el desarrollo asexual. Este hecho confirma que la adición de los metabolitos excretados por el hongo no es suficiente para inducir un fenotipo silvestre.

Dejando a un lado el desarrollo asexual, la caracterización fenotípica en torno al desarrollo sexual de una cepa *ΔfluG* confirmó que FluG tiene un papel importante en la

regulación del ciclo sexual. Este resultado está en concordancia con las observaciones llevadas a cabo por Chang et al. (2012), en el que detalla que la delección de *fluG* en *Aspergillus flavus* tiene efecto tanto en el desarrollo asexual como el sexual del hongo.

El desarrollo asexual y sexual de *A. nidulans*, está condicionado por las condiciones lumínicas, las cuales son detectadas por el complejo velvet. En este aspecto, varios estudios han relacionado a FluG con la respuesta a la luz. Sin embargo, los experimentos de localización mediante microscopía de fluorescencia llevados a cabo en este estudio confirmaron que FluG muestra una distribución homogénea mayoritariamente por todo el citoplasma de las hifas vegetativas, de acuerdo con las primeras observaciones (Lee y Adams, 1994) y la ausencia de fluorescencia amarilla en el núcleo, descartan que FluG entre de manera general al compartimento nuclear en *A. nidulans* (Chang et al., 2013). Cabe destacar que varios estudios relacionan la actividad de FluG con el gen *veA* (*velvet*) (Yager et al., 1998; Ruger-Herreros et al., 2011), el cual tiene un papel importante en la respuesta a la luz (Mooney y Yager, 1990). Yager et al. (1998) describieron mutaciones puntuales del gen *fluG* entre los que se encontró un mutante insensible a la luz roja (*fluG701*) y tres mutantes que suprimían la insensibilidad a la luz provocada por el alelo *veA1* (*fluG10^{sveA1}*; *veA1*, *fluG20^{sveA1}*; *veA1*, *fluG30^{sveA1}*; *veA1*). Este mismo estudio confirmó por un lado que el metabolito de FluG solo se sintetizaba en presencia de la luz en cepas con un fondo genético sensible (*veA*) e insensible (*veA1*) a la luz. Por otro lado, este estudio resaltó también que la complementación se observaba solo en aquellas cepas nulas en el gen *fluG* con un fondo genético *veA1* (Yager et al., 1998).

Por otro lado, los fenotipos observados de los diferentes mutantes etiquetados en los extremos N- y C-terminal de FluG confirman también que el extremo C-terminal cumple una función importante en la actividad de FluG, ya que estos mutantes muestran un fenotipo aconidial y una sobreexpresión del gen *fluG*. Esta sobreexpresión coincide con el resultado obtenido por Yager et al. (1998), en el que el mutante *fluG30^{sveA1}*; *veA1*, el cual tiene dos aminoácidos más en el extremo C-terminal, muestra una sobreexpresión de *fluG*. Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos por Chang et al. (2013), el fenotipo aconidial observado en el mutante etiquetado en el extremo C-terminal podría sugerir que este extremo cumple una función semejante a la observada en *A. flavus*, en el que en extremo C-terminal de FluG interacciona con el extremo N-terminal de LaeA y el extremo N-terminal de VelB del complejo trimérico VelB-VeA-LaeA. Sin embargo,

teniendo en cuenta que estos experimentos de interacción se realizaron en levadura, no se puede confirmar que esta interacción ocurra también dentro del hongo.

Los resultados recogidos en este primer capítulo reflejan un espectro de acción de FluG más amplio que el que se conocía antes, ya que este abarca tanto el desarrollo asexual como el sexual. Por un lado, queda confirmado que el papel de FluG en el desarrollo asexual no está directamente relacionado con el DHA, ya que un mutante *ΔausA* que no sintetiza este metabolito secundario y muestra niveles de esporulación semejantes a los observados en una cepa silvestre. Por otro lado, en este estudio se ha observado por primera vez la localización de FluG *in vivo*, confirmando que FluG se localiza mayoritariamente en el citoplasma, excluido del núcleo. Finalmente, el estudio de las distintas cepas etiquetadas de FluG ha permitido identificar que el extremo C-terminal de esta proteína tiene una función importante asociada tanto con el desarrollo del hongo como la expresión del mismo gen, aspecto que se discutirá en posteriores capítulos.

Estos hechos, nos han conducido a llevar a cabo un estudio bioinformático en profundidad de la secuencia proteica de FluG, utilizando las últimas herramientas y bases de datos accesibles.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE SECUENCIA Y PREDICCIÓN FUNCIONAL DE FLUG

1. Introducción

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior aclaran aspectos básicos sobre FluG. En primer lugar, queda demostrado que la inducción de la conidiación mediada por DHO no tiene relación con la señal dependiente de FluG. Por otra parte, muestran que la proteína se encuentra distribuida de manera homogénea a lo largo del citoplasma en hifas vegetativas, en contraste con otros factores involucrados en la inducción del desarrollo asexual, como F1bB, F1bC, F1bD y F1bE (Etxebeste et al., 2010a). Finalmente, FluG no sólo es necesario para inducir el desarrollo asexual, sino que también participa en el desarrollo sexual, por lo que no es específico de una ruta de desarrollo. En resumen, no existen datos que relacionen a FluG con otros factores del desarrollo asexual ya mencionados, y parecería que podría tratarse de un enzima cuya actividad es necesaria para el proceso, como podría ser el caso de GmcA (Etxebeste et al., 2012). Estudios anteriores sugieren que el número de genes requeridos para la conidiación podría estar en el rango de 45 a 150, sin que esto necesariamente signifique que sean factores reguladores del proceso (Martinelli and Clutterbuck, 1971). Puesto que los resultados obtenidos no permiten asociar la hipotética función de FluG con la de factores reguladores antes citados, se consideró realizar un análisis bioinformático de su secuencia.

Las primeras predicciones sobre la secuencia de FluG reportaron que las regiones N- y C-terminal de la proteína mostraban similitud con una amidohidrolasa de tipo 2 (Rexer et al., 2006) y una glutamina sintetasa de tipo 1 (GSI) (Lee y Adams, 1994), respectivamente, ambas de origen bacteriano. Las amidohidrolasas de tipo 2 se incluyen en una superfamilia de siete grupos (Holm y Sander, 1997) y se caracterizan por la presencia de un centro catalítico mono- o bi-nuclear imbuido en una estructura conocida como barril- $(\alpha/\beta)_8$ (Seibert y Raushel, 2005). Más allá de sus características comunes, el grupo de las aminohidrolasas del tipo 2 es bastante heterogéneo en cuanto a los sustratos y mecanismos de reacción.

Por otra parte, las GSI forman parte de la superfamilia de las carboxilato-amino/amonio ligasas, junto con las GSII y GSIII (Brown et al., 1994), las cuales catalizan una reacción de condensación de un glutamato y una molécula de amonio, para formar glutamina (Eisenberg et al., 1987). Las GSI se encuentran en procariotas y arqueas (Eisenberg et al., 2000). Las GSII se encuentran en bacterias de suelo y eucariotas (Unno

et al., 2006; Krajewski et al., 2008), mientras que las GSIII están presentes en ciertas bacterias anaeróbicas y cianobacterias (van Rooyen et al., 2011).

Desde el punto de vista mecánico, la reacción de las GSI ocurre en una cavidad con forma de dos embudos unidos por un túnel, en el que se localizan dos centros metálicos ($M\alpha$ y $M\beta$). Tanto la estructura tridimensional como el esquema del mecanismo de reacción de las GSI se detalla paso a paso en la Figura 18.

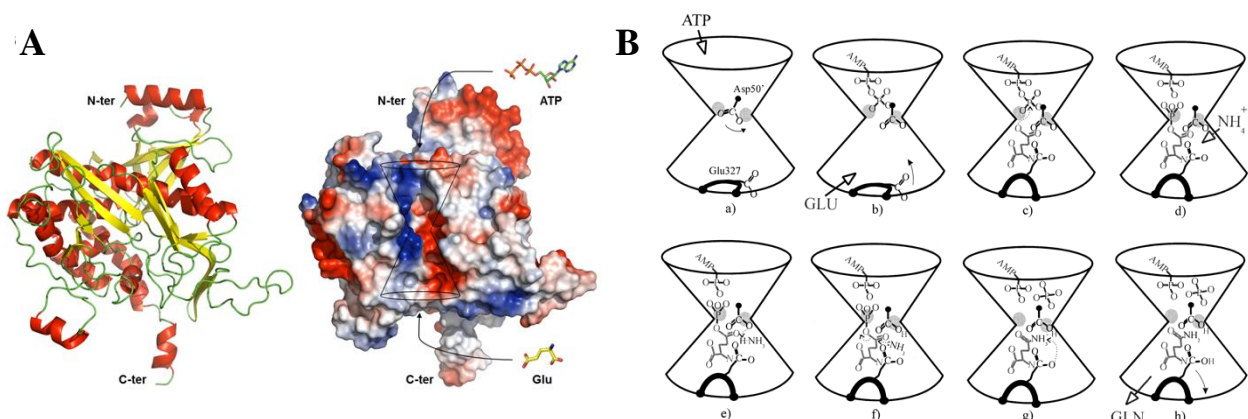


Figura 18. **A)** Representación tridimensional de una GS (Joo et al., 2018). **B).** Esquema ilustrando el centro activo de una GS en el que se describe el mecanismo de síntesis de la glutamina. Los centros metálicos $M\alpha$ y $M\beta$ (reflejados como dos bolas grises) se sitúan en el cuello entre ambos embudos. **(a-b)** Los sustratos ATP (AMP-P-P) y el glutamato (Glu) acceden al centro catalítico desde la parte superior e inferior de los embudos, respectivamente, en el que se llevan a cabo las distintas etapas y reacciones **(c-g)** que culminan con la formación la glutamina (Gln) y ADP (AMP-P). Modificado a partir de (Eisenberg et al., 2000).

En base a estos conocimientos preliminares en torno a estas dos hipotéticas regiones de FluG, se optó por desarrollar una estrategia de análisis bioinformático consistente en tres etapas consecutivas (Figura 19). En la primera etapa, se efectuó un rastreo con predictores de dominios específicos. En una segunda etapa, se realizó una búsqueda de dominios de FluG cuya secuencia tuviera una función asignada. Cada dominio se analizó individualmente mediante una búsqueda bibliográfica, para conocer el estado del conocimiento sobre la función de los residuos más conservados, y reconocerlos en la secuencia de FluG. En una tercera etapa, se buscaron estructuras de cristal que tuvieran homología con las regiones N- y C-terminal de FluG. Esta búsqueda se realizó con la herramienta bioinformática Swiss-Model (13. Herramientas de análisis bioinformático). Una vez obtenidas varias estructuras de cristal homólogas, se prestó especial atención a aquellas que hubieran sido caracterizadas y tuvieran similitud estructural con las secuencias de FluG. Una vez finalizada la búsqueda de homólogos cristalinos, se

seleccionaron aquellas estructuras que tuvieran tanto los residuos catalíticos conservados como una similitud estructural aceptable, para poder posteriormente servir de molde para generar un modelo de estructura de ambas regiones de FluG (Figura 19).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos con esta estrategia.

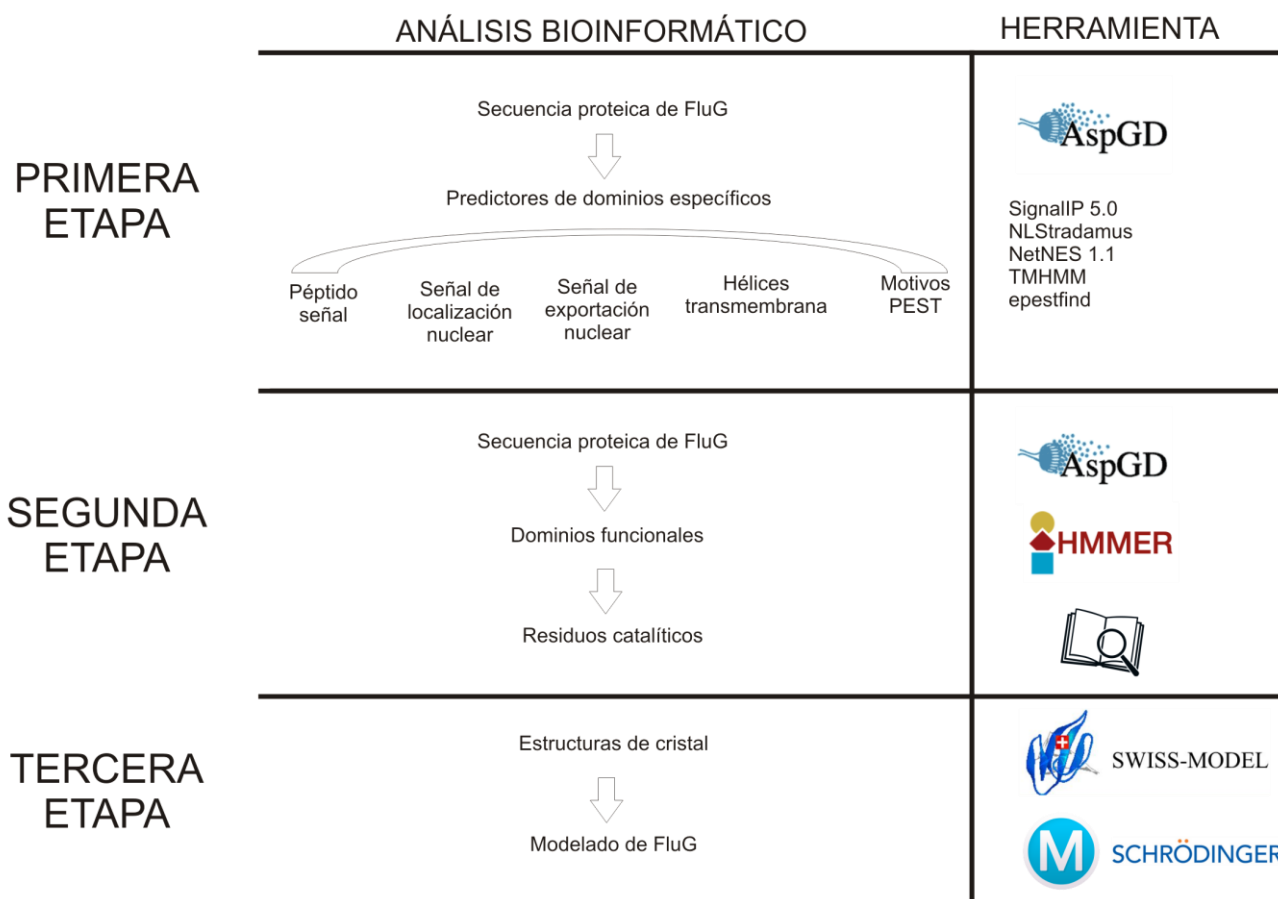


Figura 19. Esquema del proceso de análisis bioinformático llevado a cabo, junto con las herramientas bioinformáticas utilizadas en cada etapa.

2. Resultados

2.1. Primera Etapa. FluG contiene dos regiones afines a sendos dominios enzimáticos

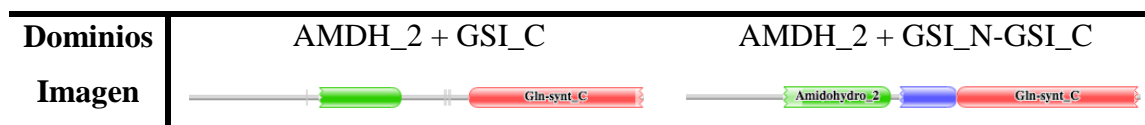
Un primer rastreo dirigido a identificar secuencias típicas de algunas funciones en proteínas reveló que la secuencia de FluG no contiene secuencias que coincidan con un péptido señal, dominios transmembrana o señales de localización y exportación nuclear (Anexo 3). No obstante, se detectaron dos secuencias PEST en la región C-terminal de FluG entre los aminoácidos 529-541 (score 6,84) y 571-590 (score 4,62) (Anexo 4), las cuales funcionan como péptido señales para inducir la proteólisis (Rechsteiner y Rogers, 1996).

La identificación de motivos funcionales conservados por homología de secuencias determinó que FluG codifica dos dominios bien definidos en las regiones N- y C-terminal de la proteína. Ambas regiones están unidas por una secuencia de aproximadamente veinte aminoácidos que funciona como un ‘linker’ (conector sin otra función reconocida). Este mismo análisis confirmó que la región N-terminal tiene similitud con amidohidrolasas de tipo 2 (AMDH_2, PF04909) entre los aminoácidos 197 y 406, mientras que la región C-terminal se asemeja a una glutamina sintetasa de tipo 1 (GSI, PF00120) entre los aminoácidos 537 y 865 (Tabla 16).

Tabla 16. Predicción de los motivos funcionales reconocidos por la herramienta HMMER. Este predictor reconoce dos dominios definidos en la región N- y C-terminal de FluG.

Familia	Descripción	Longitud del HMM	Valor de E
Amidohidro_2	Amidohidrolasa	291	$4.2 e^{-15}$
Gln_synt_C	Glutamina sintetasa, dominio catalítico	345	$1.6 e^{-63}$

Estos resultados confirman las observaciones mencionadas tanto por Lee y Adams (1994) como por Rexer et al. (2006) para las regiones N- y C-terminal de la proteína. Este mismo estudio desveló la existencia de varias proteínas cuya estructura estaba formada por una AMDH_2 y una GSI en el mismo polipéptido (Tabla 17). Un análisis detallado de los candidatos recogidos por el predictor confirmó que esta distribución de dominios se encuentra también en otros hongos y en plantas.

Tabla 17. Genes que conservan la misma disposición de dominios que la observada en FluG.

2.2. Estudio bioinformático de la región N-terminal

2.2.1. Segunda Etapa. Conservación de los residuos catalíticos predichos

Los resultados obtenidos con respecto a la predicha función amidohidrolasa de la región N-terminal propiciaron la búsqueda de información para esta amplia familia de enzimas. Seibert y Raushel (2005) las dividieron en siete subgrupos, como se muestra en la Tabla 18, y en la que se muestran los aminoácidos conservados de cada subgrupo.

Tabla 18. Clasificación de los subgrupos de amidohidrolasas presentes en la familia de amidohidrolasas. En cada subgrupo se detallan los metales presentes en las enzimas y la posición de la lámina beta en la que se encuentran los aminoácidos que se unen a estos metales. ^(a) Estos residuos se encuentran en el sitio activo, pero no están unidos directamente al metal. Su función es incierta, ya que, en algunos casos, un segundo metal puede ser acomodado en el sitio activo, pero no es necesario para cumplir la actividad catalítica. ^(b) Estos residuos no están unidos directamente al metal, pero están coordinados con un enlace de hidrógeno al agua hidrolítica. **PTE:** Fosfotriesterasa. **DHO:** Dihidroorotasa. **IAD:** Iso-aspartil dipeptidasa. **URE:** Ureasa. **HYD:** Hidantoinasa. **PHP:** Proteína homóloga a una fosfotriesterasa. **ADA:** Adenosin deaminasa. **CDA:** Citosin deaminasa. **AGD:** N-acetil glucosamin-6-fosfato deacetilasa. **DAA:** D-aminoácido ciclasa. **RDP:** Dipeptidasa renal. **URI:** Uronato isomerasa.

Subgrupo	Metales	Posición	Lámina beta								Enzimas	
			1	2	3	4	5	6	7	8		
I	Zn, Ni	α, β	HxH				K	H	H		D	PTE, DHO, IAD, URE, HYD
II	Zn	α, β	HxH				E	H	H		D	PHP
III	Zn, Fe	α	HxH					H	H ^b		D	ADA, CDA
IV	Fe	β	HxH ^a		E			H	H		D ^b	AGD
V	Zn	β	HxH ^a	C				H	H		D ^b	DAA
VI	Zn	α, β	HxD		E			H	H		D ^b	RDP
VII			HxH					H			D	URI

Mediante un alineamiento de las secuencias seleccionadas de cada subgrupo con la región N-terminal, se calculó el porcentaje de identidad de la matriz (PIM), en base a la identidad media conservada entre dos candidatos (Tabla del Anexo 5).

El mismo proceso se llevó a cabo utilizando las estructuras de cristal propuestas por Seibert y Raushel (2005), para determinar con más fiabilidad tanto los residuos catalíticos presentes en la región N-terminal, junto con la homología que presenta esta región con el la estructura de cristal de la enzima candidata. En este caso, el factor que determina la similitud estructural de la región N-terminal con el cristal utilizado como modelo se reflejó como QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) (Benkert P. et al., 2011). Este factor, representa una función que recoge la calidad de la alineación global (la estructura de cristal) y la residual (cada residuo) de la secuencia de interés, frente al modelo utilizado como estructura de cristal (Tabla 19). Se considera un QMEAN aceptable cuando los valores son superiores a -4.

Tabla 19. Resultados obtenidos del alineamiento de la región N-terminal de FluG con los cristales propuestos por (Seibert y Raushel, 2005) de cada subgrupo. En cada subgrupo se detalla, por un lado, la cobertura que tiene el cristal con la región N-terminal de FluG y la conservación de los aminoácidos que se unen a los metales. Los aminoácidos conservados están resaltados en **verde**. Por otro lado, se detalla el porcentaje de identidad que conserva esta región con la estructura de cristal de la enzima de cada subgrupo, junto con la conservación estructural reflejada como valor QMEAN. (*) No se pudo generar un modelo debido a la baja calidad de la homología.

Subgrupo	Enzimas y nombre del pdb	Cobertura con FluG	Residuos alineados								Identidad de secuencia (%)	QMEAN
			1	2	3	4	5	6	7	8		
I	PTE (1HZY)	239-406	HxH	-	-	K	H	H	-	D	12,16	-4,10
II	PHP (1BF6)	240-406	HxH	-	-	E	H	H	-	D	10,67	-6,51
III	ADA (1AM4)	15-382	HxH				H	H		D	27,48	-8,79
IV	AGD (1O12)		HxH		E		H	H		D	*	*
V	DAA (1M7J)	110-405	HxH	C			H	H		D	32,03	-8,25
VI	RDP (1ITQ)	234-406	HxD		E		H	H		D	12,50	-7,32
VII	URI	-	HxH				H			D	-	-

Los datos obtenidos en la Tabla 19 y la Tabla del Anexo 5 indican que la región N-terminal de FluG guarda una mayor similitud con las amidohidrolasas de tipo I (AMDH_1), al contrario de lo que se había obtenido en la primera aproximación (Tabla 16). No obstante, el grupo de las AMDH_1 está representado por una amplia variedad de enzimas que catalizan reacciones muy distintas, a pesar de tener en común gran parte de los residuos catalíticos que las unen a los centros metálicos (Seibert y Raushel, 2005). Esta razón, nos llevó a profundizar en la búsqueda de estructuras de cristal que tuvieran similitud con la región N-terminal, con el objetivo de poder crear un modelo cristalino de la región N-terminal de FluG.

2.2.2. Tercera Etapa. Búsqueda de homólogos cristalinos de la región N-terminal

Tras determinar la similitud de secuencia con amidohidrolasas del tipo I, se procedió a la búsqueda de estructuras de cristal resueltas que conservasen homología con la región N-terminal. Las estructuras de cristal obtenidas mediante Swiss-Model, junto con información relevante en torno a la cobertura e identidad y con la homología estructural de estos cristales con la región de interés, se recogen en la tabla del Anexo 6. Todos los cristales candidatos seleccionados, a excepción del cristal 2QPX, estaban caracterizados previamente (Tabla 20). En cuanto 2QPX, solo se contaba con la estructura.

Los cristales tienen varias funciones enzimáticas asignadas. Por tanto, se dividieron en dos grupos: aquellos cuya función enzimática había sido caracterizada y publicada, y aquellos que solo tenían una función predicha. Ambos grupos contienen candidatos que cubren la región N-terminal al completo (aas 1-410) o parcialmente (aas 185-410), siendo estos últimos los mayoritarios. Por otro lado, la similitud con la región N-terminal oscila entre el 12% y el 19% en la mayoría de los modelos. Sin embargo, se puede observar que los cristales 2QPX y 4HJW muestran valores superiores al 20% (29,32 y 23,04, respectivamente). Sin embargo, los valores del factor QMEAN obtenidos de cada modelo generado demuestran que solo el modelo 3IRS supera el valor aceptable de -4. Sin embargo, solo abarca parte de la región N-terminal (aas 185-410) y su función enzimática no ha sido caracterizada.

En vista de los resultados, se optó por seleccionar aquellos cristales que hubieran sido caracterizados, cubrieran la totalidad de la región N-terminal en la medida de lo posible, y exhibieran un valor QMEAN lo más cercano posible al -4. Se tuvieron en cuenta también otros candidatos que, aunque no estuvieran caracterizados, cubrieran la totalidad de la región N-terminal de FluG y exhibieran un valor QMEAN aceptable. Los cristales seleccionados están recogidos en la Tabla 20.

Tabla 20. Cristales homólogos a la región N-terminal de FluG. En cada cristal se especifica por un lado el nombre pdb, la función asignada, los ligandos presentes en el cristal, el organismo del que proviene y la referencia de la publicación. Por otro lado, se detalla la cobertura que tiene el cristal con la región N-terminal de FluG, el porcentaje de identidad que conserva esta región con la estructura de cristal y la conservación estructural reflejada como valor QMEAN.

Cristal	Función	Cobertura con FluG	Identidad de la secuencia	QMEAN	Ligandos	Organismo	Referencia
1J5S	Uronato isomerasa	5-408	14,68	-5,26	-	<i>Thermotoga maritima</i>	Schwarzenbacher R. et al 2003
3HK8	Uronato isomerasa	5-408	14,25	-6,93	Zn + HDL	<i>Bacillus halodurans</i>	Nguyen TT. Et al., 2009
4HJW	Uracil-5-carboxilato decarboxilasa	185-410	23,04	-5,73	Zn	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Xu S. et al., 2013
6DXQ	4-oxalomesaconato hidratasa	185-409	16,84	-4,58	Zn + 7QD	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Hogancamp TN. Et al., 2018
6E6I	Hidrolasa de enlace meta del compuesto 2,2',3-trihydroxi-3'-metoxi-5,5'-dicarboxibifenil	185-410	16,49	-5,49	Zn + HVS	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Kuatsjah E. et al., 2018
4IFK	2-amino-3-carboximuconato 6-semialdehido decarboxilasa	185-410	13,59	-5,60	Zn	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huo L. et al., 2013
3DC8	Dihidropirimidinasa	236-409	16,56	-4,84	Zn	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Martinez-Rodriguez S. et al., 2010
2QPX	Amidohidrolasa metalodependiente TIM-barrel fold	4-406	29,32	-4,10	Zn	<i>Lactobacillus paracasei ATCC 334</i>	Joint Center for Structural Genomics (JCSG)

Una vez seleccionados los candidatos, se procedió a catalogar al grupo de amidohidrolasas que pertenecía cada cristal, utilizando para ello la herramienta HMMER. Tanto los candidatos seleccionados como la predicción obtenida están reflejados en la Tabla 21. De la misma forma, se analizó la conservación de los residuos catalíticos de los cristales catalogados en la Tabla 20 y la región N-terminal de FluG, la cual se presenta en la tabla del Anexo 7.

Tabla 21. Resultados del análisis de los cristales homólogos a la región N-terminal de FluG con la herramienta de predicción funcional HMMER. Cristales homólogos a la región N-terminal de FluG. En cada caso se detalla la cobertura que tiene el cristal con la región N-terminal de FluG y la predicción funcional, junto con la cobertura de aminoácidos predicha con la herramienta HMMER. Por otro lado, se adjunta una imagen con la disposición de las regiones funcionales delimitadas por la herramienta HMMER.

Cristal	Función	Cobertura con FluG	Predicción HMMER	Cobertura HMMER	Imagen HMMER
1J5S	Uronato isomerasa	8-408	UxaC	2-449	
3HK8	Uronato isomerasa	5-408	-	-	
4HJW	Uracil-5-carboxilato decarboxilasa	185-410	Amidohidro_2	9-373	
6DXQ	4-oxalomesaconato hidratasa	185-409	Amidohidro_2	5-330	
6E6I	Hidrolasa de enlace meta del compuesto 2,2',3-trihidroxi-3'-metoxi-5,5'-dicarboxibifenil	185-410	Amidohidro_2	3-330	
4IFK	2-amino-3-carboximuconato 6-semialdehido decarboxilasa	185-410	Amidohidro_2	6-331	
3DC8	Dihidropirimidinasas	236-409	Amidohidro_1	47-419	
2QPX	Amidohidrolasa metalodependiente TIM-barrel fold	4-406	Amidohidro_2	201-368	
FluG	-	-	Amidohidro_2	243-407	

Una vez analizados los resultados de la Tabla 21, se pudo apreciar que las enzimas homólogas a la región N-terminal de FluG pertenecen a los subgrupos amidohidrolasa de tipo I, II y uronato isomerasa (UxaC). Tanto el cristal 2QPX como la región N-terminal comparten parte de la proteína, la cual es homóloga a las amidohidrolasas de tipo II.

Los resultados de la conservación de los residuos catalíticos en cada cristal, desvelaron que los únicos residuos conservados en todas las amidohidrolasas son aquellos que se unen al metal $M\alpha$, correspondientes a los residuos H20; H22 y D354 en FluG. El siguiente residuo que parece estar más conservado es H264 en FluG, cuyo papel es también el de unión al metal $M\alpha$ o $M\beta$. Otro residuo que parece tener una alta conservación en la mayoría de las enzimas, es el correspondiente a la H298 en FluG.

Puesto que la conservación de los residuos observada en la Tabla del Anexo 7 muestra un amplio espectro de actividades enzimáticas, para la siguiente fase se dio más prioridad a aquellas enzimas que abarcaran la totalidad de la región N-terminal (Tabla 21) y exhibieran un índice QMEAN aceptable (Tabla 20). La combinación de ambos datos indicó que esta región conservaba todos los residuos correspondientes a la estructura de cristal 3DC8, la cual tiene una actividad dihidropirimidinasasa. Sin embargo, los valores la cobertura de este cristal solamente abarcaban el rango 236-409, con un valor QMEAN de - 4,84. Por otro lado, se observó que los cristales 1J5S y 3HK8, a pesar de contar con un valor QMEAN pobre, abarcaban gran parte de la región N-terminal y los residuos de unión al $M\alpha$ estaban conservados en FluG. Finalmente, se comprobó que el candidato 2QPX (el cual no había sido caracterizado) conservaba todos los residuos correspondientes a una dihidropirimidinasasa, además de cubrir casi al completo la región N-terminal de FluG (4-406) con una homología estructural muy aceptable, reflejado por un valor QMEAN de - 4,30. Por lo tanto, adoptamos a 1J5S, 3HK8 y 2QPX como modelo porque abarcan la totalidad de la región.

2.2.3. Tercera Etapa. Generación del modelo estructural de la región N-terminal

La búsqueda de cristales homólogos a la región N-terminal de FluG permitió identificar una gran variedad de homólogos que, posteriormente fueron analizados en detalle para descartar los menos adecuados para usarlos como molde. Una vez finalizado el proceso de criba, los cristales que fueron seleccionados para modelar ambas regiones de FluG están detallados en la Tabla 22.

Una vez optimizados los modelos de las estructuras de cristal candidatas para esta región, se utilizaron como molde para modelar la región N-terminal. Los aminoácidos de FluG se alinearon con el modelo en base del alineamiento obtenido con Swiss-Model, y se calculo el porcentaje de identidad y similitud que comparte la secuencia de FluG con la estructura usada para el modelado empleando la herramienta Prime del programa Maestro (Schrödinger Suites) (Tabla 22).

Tabla 22. Los modelos utilizados para modelar la región N-terminal de FluG, junto con los ligandos presentes en cada cristal. Se detallan los valores correspondientes a la cobertura del cristal con esta región de FluG, el porcentaje de similitud, identidad y huecos presentes en el proceso de modelado. **Zn:** Zinc. **HDL:** Ácido D-Arabinohidroxámico.

N-terminal de FluG			
Cristal	1J5S	3HK8	2QPX
Ligandos	-	Zn + HDL	Zn
Cobertura	5-408	5-408	4-406
% Similitud	22	26	43
% Identidad	10	10	25
% Huecos	25	22	11

La superposición de los tres modelos a partir de los cristales (Figura 20, Figura 21 y Figura 22), permite observar distintos grados de conservación en lo que respecta a los residuos catalíticos de interés (Tabla del Anexo 7).

En 1J5S, a pesar de no haber un metal presente en el cristal, los residuos H30, H32 y D397 se coordinan al $M\alpha$. Como se puede observar en la Figura 20, el modelo predicho de la región N-terminal FluG que se ha generado a partir de la estructura de 1J5S conserva todos los residuos mencionados anteriormente (H20, H22 y D354) con una disposición espacial semejante.

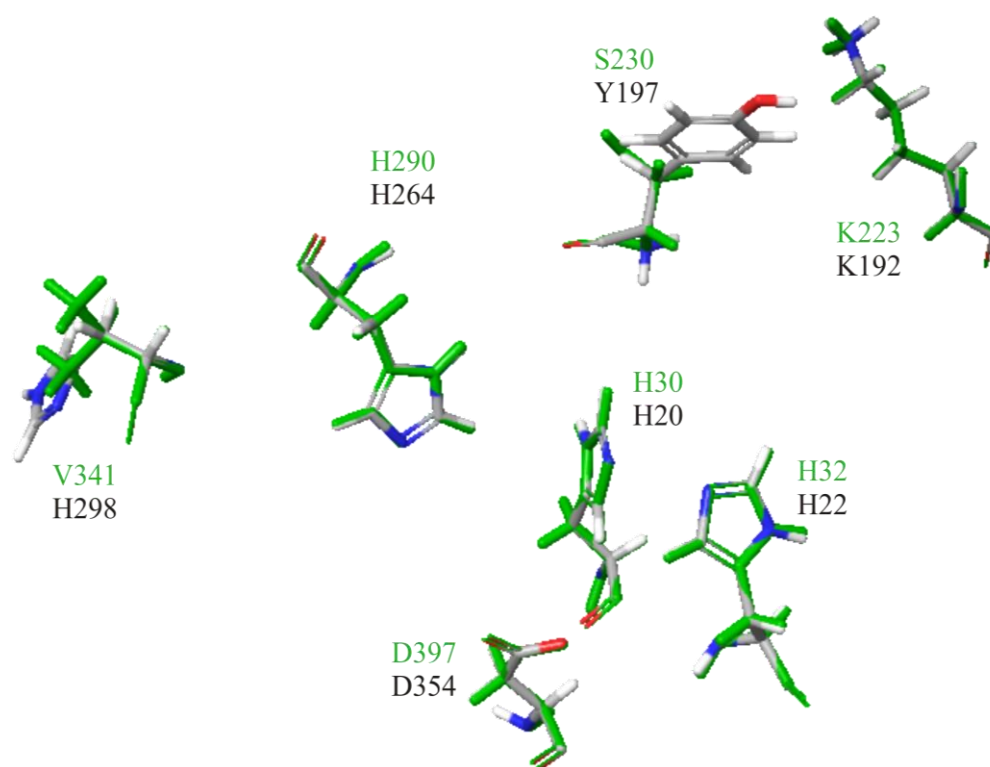


Figura 20. Alineación estructural del modelo 1J5S (**verde**), con la estructura modelada de FluG (**gris**), basada en la plantilla 1J5S. Los residuos conservados en FluG son H20, H22, H264 y D354.

En 3HK8, los residuos H26, H28 y el D355 se coordinan al ion de Zn^{2+} ($M\alpha$). Por otro lado, el residuo D355 se coordina también al sustrato para asistir la reacción de isomerización (Nguyen et al., 2009). Como se puede observar en la Figura 21, el modelo predicho de la región N-terminal que se ha generado a partir de la estructura de 3HK8 conserva todos los residuos mencionados anteriormente (H20, H22 y D354) con una disposición espacial adecuada para formar las mismas interacciones que se observan en cristal 3HK8 con el ion de Zn^{2+} y el sustrato.

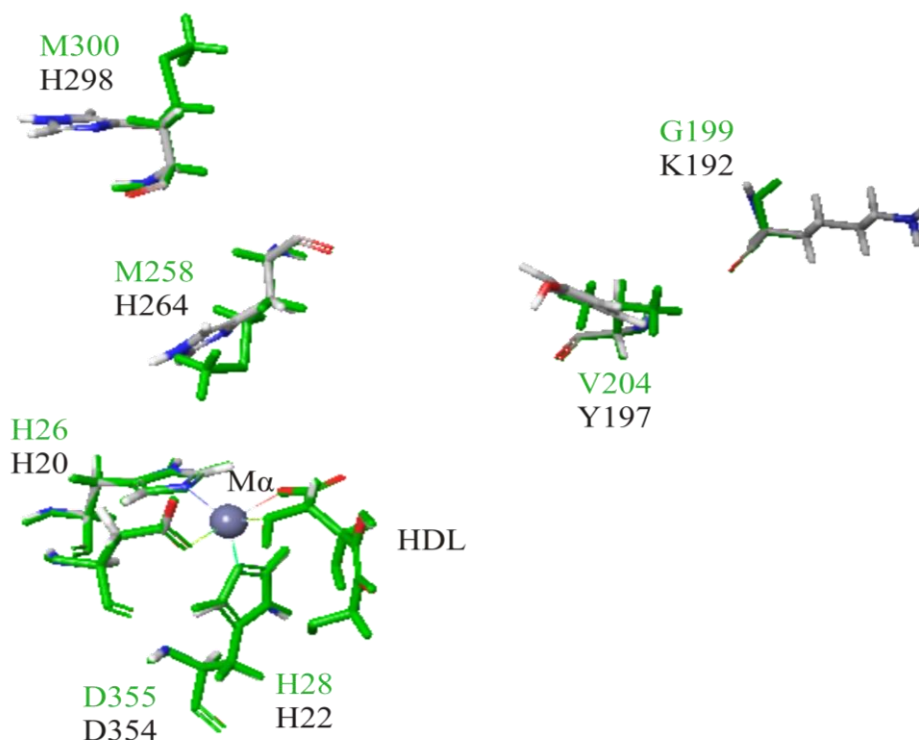


Figura 21. Alineación estructural del modelo 3HK8 (verde), con la estructura modelada de FluG (gris), basada en la plantilla 3HK8. El $M\alpha$ está coordinado a H20, H22 y D354. El sustrato (HDL) está coordinado al metal.

En el caso de 2QPX, los residuos H17, H19 y D317 se coordinan con el primer ion de Zn^{2+} ($M\alpha$), mientras que los residuos H227 y H263 se coordinan al segundo ion de Zn^{2+} ($M\beta$). Por otro lado, se predice que una lisina (K166) sufre una carbamilación post-traducciona para formar un puente entre los dos iones de Zn^{2+} , y que una tirosina (Y171) puede interactuar con el sustrato en algunas amidohidrolasas. Como se puede observar en la Figura 22, el modelo predicho de la región N-terminal de FluG que se ha generado a partir de la estructura de 2QPX conserva todos los residuos mencionados anteriormente (H20, H22, K192, H264, H298 y D354) con una disposición espacial adecuada para formar las mismas interacciones que se observan en la estructura de 2QPX con los iones de Zn^{2+} y el agua hidrolítica, junto con la tirosina (Y197) la cual puede interactuar con el sustrato (Figura 22). Sin embargo, teniendo en cuenta que la actividad de la enzima 2QPX no ha sido caracterizada, no se puede afirmar del todo que todos los residuos cumplan el mismo papel que en la proteína molde. No obstante, teniendo en cuenta que los residuos conservados en esta enzima se asemejan a aquellos presentes en una dihidropirimidinasa (Lohkamp et al., 2006; Hsieh et al., 2013), se podría asumir que los residuos de 2QPX y FluG cumplirían la misma función.

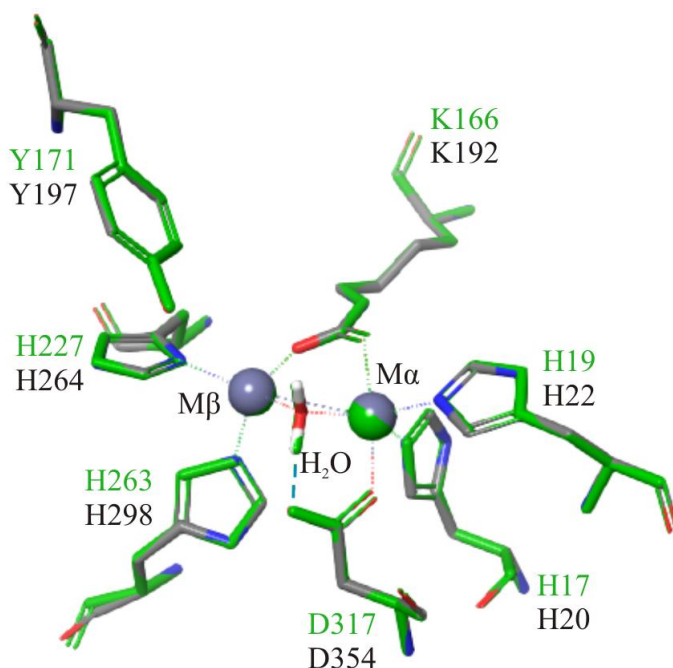


Figura 22. Alineación estructural del modelo 2QPX (**verde**), con la estructura modelada de FluG (**gris**), basada en la plantilla 2QPX. El $M\alpha$ está coordinado a H20, H22, K192 y D354; el $M\beta$ se coordina a K192, H264 y H298. Una molécula de agua se coordina con ambos metales y D354 (**línea azul discontinua**).

2.3. Estudio bioinformático de la región C-terminal

2.3.1 Segunda Etapa. Conservación de los residuos catalíticos predichos

Las predicciones situaban la región C-terminal como una GSI. Los residuos clave de esta actividad tienen que ver con las dos etapas de mecanismo catalítico. En la primera etapa, la reacción requiere la participación de ATP para formar un intermediario activado, el γ -glutamil fosfato (Eisenberg et al., 2000). Este intermediario reacciona en una segunda etapa con una molécula de amonio, para formar glutamina. Esta reacción es central en el metabolismo del nitrógeno y tiene lugar en todos los organismos (Stadtman y Ginsburg, 1974; Eisenberg et al., 2000).

Los residuos catalíticos que participan en la reacción catalizada por la GS de *Salmonella typhimurium* (*glnA*; pdb: 1FPY), a menudo empleada como modelo (Gill y Eisenberg, 2001) se detallan en la Tabla 23. La estructura de cristal se empleó como base para la numeración de los residuos. Para poder determinar la conservación de los residuos catalíticos de FluG con otras GSIs, se eligió como referencia la estructura de cristal 1FPY de *S. typhimurium*. Los datos de la conservación junto con el papel que desempeña cada uno de los residuos catalíticos (Eisenberg et al., 2000) se reflejan en la Tabla 23.

Tabla 23. Residuos catalíticos de la estructura de cristal 1FPY, junto con su función, que participan en la síntesis de glutamina y que están conservados en la región C-terminal de FluG (Eisenberg et al., 2000; Murray et al., 2013). Están marcados en **gris** los residuos que no están conservados.

Residuos		Función
1FPY	FluG	
D50	S481	Extrae el protón del ion de amonio para formar amoniaco
E130	E564	Se une al metal Mg^{2+} ($M\beta$)
E132	E566	Se une al metal Mg^{2+} ($M\alpha$); susceptible a interaccionar con inhibidores
E213	E626	Se une al metal Mg^{2+} ($M\alpha$) y a la molécula de NH_3
E221	E633	Se une al metal Mg^{2+} ($M\alpha$)
H270	H682	Se une al metal Mg^{2+} ($M\beta$), mediante el nitrógeno
H272	H684	Interacciona con el γ -fosfato del ATP
R322	R720	Interacciona con el grupo amida del glutamato
E328	W726	Extrae el protón del estado de transición para formar glutamina y ADP
R340	R739	Polariza el γ -fosfato del ATP que formará el intermediario γ -glutamil fosfato
R345	R744	Interacciona con el ATP en el estado de transición
E358	E752	Se une al metal Mg^{2+} ($M\beta$)

El análisis comparativo de la homología entre la estructura de cristal de 1FPY y la región C-terminal de FluG desveló una similitud del 20,05% y un valor QMEAN de - 4,23. Teniendo en cuenta que el cristal cubre gran parte de la región C-terminal de FluG (431-863) el valor QMEAN muestra que FluG presenta una similitud considerable. En cuanto a la conservación de residuos catalíticos, se observó que no se conservaban aquellos que interaccionan con el amonio (Tabla 23, fondo gris). Este dato indica que la glutamina no es el producto probable de la reacción. En consecuencia, se profundizó en la búsqueda de estructuras de cristal que tuvieran mayor similitud con las zonas diferenciadas.

2.3.2. Tercera Etapa. Búsqueda de homólogos cristalinos de la región C-terminal

Un rastreo de estructuras con homología a la región C-terminal con la herramienta Swiss-Model dio lugar a la lista que se presenta en la tabla del Anexo 8. Todos los cristales seleccionados fueron previamente caracterizados y clasificados (Tabla 24).

Tabla 24. Cristales homólogos a la región C-terminal de FluG. En cada cristal se especifica por un lado el nombre pdb, la función asignada, los ligandos presentes en el cristal, el organismo del que proviene y la referencia de la publicación. Por otro lado, se detalla la cobertura que tiene el cristal con la región C-terminal de FluG, el porcentaje de identidad que conserva esta región con la estructura de cristal y la homología estructural reflejada como valor QMEAN.

Cristal	Función	Cobertura con FluG	Identidad de la secuencia	QMEAN	Ligandos	Organismo	Referencia
2WHI	GS	429-863	23,80	-3,27	P3S + Mg + 1AZ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nilsson, M.T. et al 2009
4LNI	GS	434-845	33,33	-5,05	P3S + Mg + ADP	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
5ZLP	GS	429-863	24,16	-4,29	Mg + PPQ + P3P + ADP + ATP	<i>Heliobacter pylori</i>	Joo HK et al., 2018
1FPY	GS	431-863	20,05	-4,32	PPQ + Mn + ADP	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gill HS. Et al., 2001
4XYC	GS	429-863	23,80	-3,99	2K9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Couturier C. et al., 2015
4LNF	GS	434-845	33,33	-4,63	Mg + GLN	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
4LNN	GS	434-845	33,33	-5,45	Mg	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
4HPP	Probable GS	443-865	26,73	-3,93	Mg + Ca + GLU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ladner JE et al., 2012

La mayoría de los cristales tenían asignada una función de GS y cubrían la totalidad de esta región (434 aminoácidos), con porcentajes de identidad entre 20 y 33%, considerados como limítrofes en el rango de aceptabilidad de la similitud proteica (Rost, 1999). Sin embargo, los valores obtenidos en el factor QMEAN, indicaron que al menos tres cristales presentaban con un valor superior a -4. Ello los validaba como candidatos para modelar la región C-terminal. Así mismo, se tuvieron en cuenta aquellos candidatos que tuvieran los ligandos esenciales para la actividad catalítica (Mg, ADP/AMP, Glu, Gln) y, salvo excepciones puntuales, que no hubiera ninguna molécula que actuase como inhibidor de la actividad de la enzima (P3S, PPQ, P3P). La conservación de los residuos catalíticos en la región C-terminal con respecto a los nuevos cristales candidatos se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. La conservación de los residuos catalíticos de cada cristal candidato frente a la región C-terminal de FluG. Los nombres de los cristales están referidos en formato pdb y la función de cada residuo está representada en el extremo derecho de la tabla. Los dos iones de magnesio que se unen a los residuos están representados como M α y M β . **ATP:** Adenosin trifosfato. **ADP:** Adenosin difosfato. Glu: Glutamato.

FluG	Residuos						Función
	2WHI	4XYC	4HPP	1FPY	5ZLP	4LNF/-N/-I	
S481	D62	D54	V42	D50	D60	D52	Extrae el protón del NH ₄ ⁺
E564	E141	E133	E131	E130	E139	E131	Unión M β
E566	E143	E135	E133	E132	E141	E133	Unión M α
E626	E227	E219	E180	E213	E223	E188	Unión M α y NH ₃
E633	E235	E227	E187	E221	E230	E195	Unión M α
H682	H284	H276	H236	H270	H279	H244	Unión M β mediante N
H684	H286	H278	H238	H272	H281	N246	Interacción γ -fosfato ATP
R720	R337	R329	R290	R322	R331	R297	Interacción amida (Glu)
W726	E343	E335	W296	E328	E337	E303	Extrae protón para formar glutamina y ADP
R739	R355	R347	R308	R340	R349	R315	Polariza γ -fosfato ATP para formar γ -glutamil fosfato
R744	R360	R352	R313	R345	R354	R320	Interacción ATP
E752	E374	E366	E332	E358	E367	E332	Unión M β
438	486	478	443	468	481	443	Nº de aminoácidos
	QMEAN < -4			QMEAN > -4			

Como se muestra en la Tabla 25, todos los cristales estudiados conservan los residuos catalíticos de unión a los metales $M\alpha$ y $M\beta$ y la interacción con ATP, necesarios para generar el intermediario γ -glutamil fosfato. Por otro lado, como se observó en anteriores resultados (Tabla 23), los residuos encargados tanto de extraer el protón de la molécula de amonio (NH_4^+), como de extraer el protón para formar la glutamina y el ADP, están también conservados en los cristales que tienen una función GS asignada. Sin embargo, el candidato 4HPP, con una función asignada de ‘probable GS’, no conserva un aspartato (D) requerido para la extracción del protón del amonio, en coincidencia con el extremo C-terminal. El aspartato (D), está sustituido por una valina (V) y una serina (S), en 4HPP y FluG, respectivamente. Desde el punto de vista de la reactividad, la valina y serina no podrían cumplir la función del aspartato. Hay un segundo residuo en las GS, un glutamato (E), que extrae el protón en el estado de transición para formar glutamina y ADP, el cual está sustituido por un triptófano (W) tanto en el 4HPP como FluG. En este caso, el cambio es muy marcado, ya que el glutamato presenta un carbonilo, mientras que el triptófano presenta una cadena lateral aromática (indol). Estas diferencias indican que, ni 4HPP ni el extremo C-terminal pueden llevar a cabo una función GS.

2.3.3. Tercera Etapa. Generación del modelo estructural de la región C-terminal

La búsqueda de cristales homólogos a la región C-terminal se realizó priorizando que abarcaran la totalidad de la región a modelar y contasen con información documentada sobre ligandos que sirviesen de molde de referencia. Una vez seleccionadas las estructuras de cristal idóneas, se emplearon como moldes, al igual que en el caso de la región N-terminal (Tabla 22). Los resultados se muestran en la (Tabla 26).

El modelado de la región C-terminal se llevó a cabo priorizando aquellos cristales que tenían confirmada una actividad GS, salvo 4HPP, el cual tiene una “probable” actividad GS. Una vez creados los modelos de FluG, se analizó la conservación estructural de los residuos citados en la Tabla 25 mediante la superposición de los seis modelos de la región C-terminal creados a partir de los cristales. Las figuras de la superposición de residuos catalíticos entre los modelos de 2WHI-FluG, 1FPY-FluG y 4LNI/4LNF/4LNN-FluG están representadas en los Anexo 9, Anexo 10 y Anexo 11, respectivamente. La superposición de los residuos del modelo 4HPP-FluG se muestra en la Figura 23. Por motivos de claridad, las figuras muestran solo aquellos residuos que fueron seleccionados como candidatos potenciales a ser mutados.

Tabla 26. Cristales seleccionados para construir el modelo estructural de la región C-terminal junto con sus ligandos correspondientes. Se detallan los valores correspondientes a la cobertura del cristal con esta región de FluG, el porcentaje de similitud, identidad y huecos presentes en el proceso de modelado. **Mg:** Magnesio. **Mn:** Manganeso. **Ca:** Calcio. **GLU:** Glutamato. **GLN:** Glutamina **ATP:** Adenosin trifosfato. **ADP:** Adenosin difosfato. **P3S:** L-metionin-S-sulfoximin fosfato. **1AZ:** 1-(3,4-diclorobenzil)-3,7-dimetil-8-morfolin-4-il-3,7-dihidro-1H-purin-2,6-diona. **PPQ:** Fosfinotricina (Análogo estructural del glutamato, se utiliza para inhibir la actividad de las GS).

C-terminal de FluG						
Registro PDB	2WHI	1FPY	4LNI	4LNF	4LNN	4HPP
Ligandos	P3S + Mg + 1AZ	PPQ + Mn + ADP	P3S + Mg + ADP	Mg + GLN	Mg	Mg + Ca+ GLU
Cobertura	429-863	431-863	434-845	434-845	434-845	443-865
% Similitud	33	32	38	38	38	33
% Identidad	19	16	24	24	24	22
% Huecos	16	15	13	13	13	17

La superposición de los cinco modelos de la región C-terminal creados a partir de los cristales 2WHI (Anexo 9), 1FPY (Anexo 10), 4LNI, 4LNF y 4LNN (Anexo 11), desveló que los residuos catalíticos estaban estructuralmente conservados en todos los modelos del C-terminal. Se confirmó que todos los residuos catalíticos cuya función se basa en la unión al metal ($M\alpha$, $M\beta$ y $M\gamma$) muestran una conformación favorable en la región C-terminal. Sin embargo, no se pudo obtener evidencia suficiente para apoyar que esta región pueda utilizar ADP, ya que en comparación a los modelos GS utilizados, la disposición estructural de los residuos R739 y R744 era notablemente distinta en la región C-terminal.

Se llevó a cabo el análisis del mecanismo de inhibición de las moléculas PPQ y P3S, las cuales se unen a los metales, bloqueando la entrada al sustrato (glutamato). Se observó que los residuos de unión a los metales están altamente conservados en la región C-terminal. Este hecho reforzó la posibilidad de que estos inhibidores puedan afectar la actividad de la región C-terminal.

Una vez finalizado el análisis de las GS, se modeló la estructura de la región C-terminal utilizando en modelo 4HPP (Figura 23). La superposición entre ambos modelos mostró que residuos catalíticos (Tabla 25) estaban estructuralmente conservados. Los aminoácidos que coordinan el ion metálico (un Mg^{2+} [$M\alpha$] coordinado a E133, E180 y E187) estaban estructuralmente conservados en la región C-terminal (E566 y E626). Además, los residuos que se unen al ligando glutamato (R290 en 4HPP) e interactúan con ATP (H238, R308 y R313 en 4HPP) estaban presentes en FluG (R720 para el glutamato; H682, R739 y R744 para el ATP, respectivamente).

Los resultados confirmaron que los residuos que se coordinan con el ion de magnesio (un único centro metálico en este caso) están completamente conservados en la región C-terminal. Por otro lado, las estructuras cristalinas de las GSI analizadas en este apartado (2WHI, 1FPY, 4LNI, 4LNF y 4LNN), contienen un residuo de glutamato (E), que la estructura cristalina de la γ -glutamil ligasa (4HPP) y el modelo FluG (C-terminal) no conservan en la posición equivalente (contienen un triptófano, W296 y W726, respectivamente).

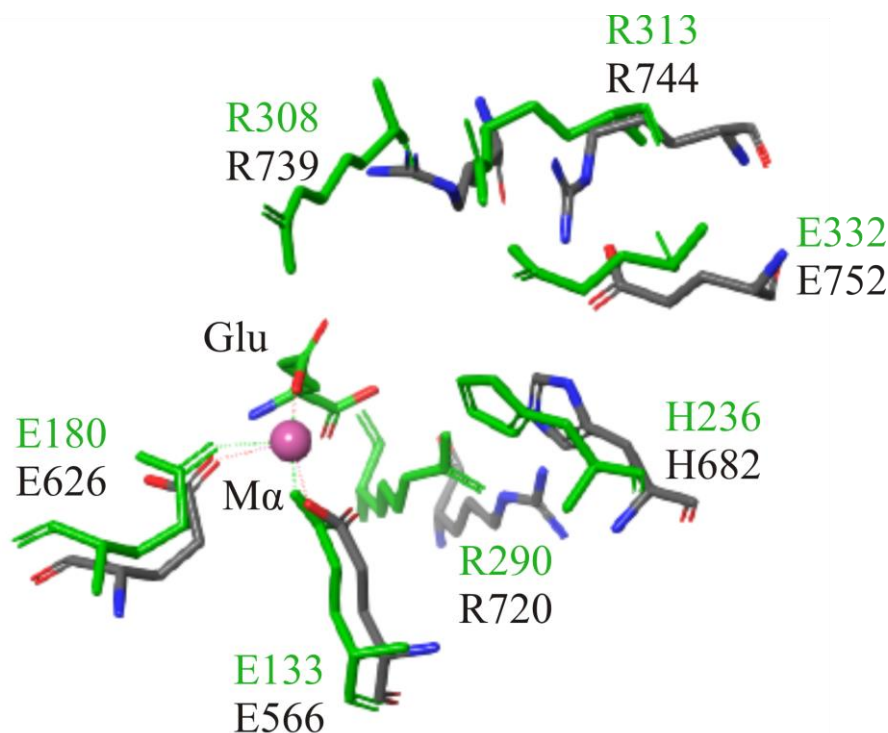


Figura 23. Superposición estructural de 4HPP (verde) con el modelo de FluG (gris). Sólo se muestran los residuos mutados en este trabajo. La coordinación de los residuos entre el ión Mg^{2+} ($M\alpha$ interactúa con los residuos E566 y E626) y el ligando glutamato (Glu interactúa con el residuo R720) en 4HPP es considerablemente similar en FluG.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos hasta ahora no facilitaban una visión clara de la relación entre el cristal 4HPP y la región C-terminal de FluG, se procedió a estudiar FluG en detalle siguiendo las pautas de trabajo efectuado por Ladner et al. (2012), en el que aportan varios detalles interesantes respecto a la actividad enzimática de 4HPP.

2.4. Estudio comparativo de FluG con las γ -glutamyl poliamina ligasas de *Pseudomonas aeruginosa*

En un estudio llevado a cabo en *Pseudomonas aeruginosa* se resaltaba que el gen PA5508, cuyo cristal (4HPP) y función enzimática (γ -glutamyl ligasa) fueron resueltos, fue identificado en una búsqueda de enzimas que conservaran homología con enzimas que presentaran una actividad de γ -glutamilación de las poliaminas (Yao et al., 2011). Este último estudio desveló que *P. aeruginosa* contiene siete genes parálogos (*pauA1-7*) cuyas proteínas pueden efectuar la actividad de γ -glutamilación de poliaminas (putrescina, espermidina, espermina, agmatina, cadaverina y el diaminopropano) en una ruta destinada a su asimilación como fuente de nitrógeno (Lu et al., 2002; Chou et al., 2008; Yao et al., 2011; Yao et al., 2012). A diferencia de los seis genes *pauA1-6*, la expresión del gen *pauA7* no se ve alterada en presencia de poliaminas (Yao et al., 2011).

Estos antecedentes nos llevaron a analizar el grado de similitud que conserva la región C-terminal de FluG con los seis parálogos (*pauA1-6*) y con el gen *pauA7*, valiéndonos para ello de la herramienta Clustal Omega para hacer los alineamientos de todas las secuencias proteicas, y así obtener la matriz que da el porcentaje de la identidad (Tabla A del Anexo 12). De la misma forma, se utilizó la herramienta Swiss-model para obtener el porcentaje de identidad que presenta cada gen *pauA1-6*, utilizando como molde la estructura de cristal 4HPP del gen *pauA7* (PA5508). Estos últimos valores se muestran en la Tabla B del Anexo 12.

Una vez analizados los resultados obtenidos del alineamiento de los genes *pauA1-7* con la región C-terminal (Tabla A del Anexo 12), se concluyó que el grupo de genes formado por *pauA1-6*, con un porcentaje de identidad entre el 30% y el 42%, conservan una mayor identidad entre ellos, que con *pauA7* y *fluG* (25% y 22%, respectivamente). Este resultado sugiere que, si bien los seis genes de *P. aeruginosa* que guardan mayor similitud en el alineamiento participan en la degradación de las poliaminas, *pauA7* (y

fluG) divergen de esta función. Sin embargo, los resultados obtenidos en la Tabla B del Anexo 12 muestran que todos los genes *pauA1-6* comparten una identidad de secuencia y estructural similares. Este resultado indica que, si bien todas estas enzimas comparten una considerable homología estructural, este método no permite determinar las diferencias en afinidad por distintas poliaminas. Sería plausible, por tanto, que la mayor afinidad por el sustrato podría estar relacionada con la conservación de otros residuos, así como las distancias, polaridad u otros aspectos en torno a dichos residuos. De esta forma, al igual que en apartados anteriores, se llevó a cabo un análisis en el que se verificó la conservación de los residuos catalíticos predichos para una GS en los genes *pauA1-6*, representando los resultados en la Tabla 27.

Tabla 27. La conservación de los residuos catalíticos de cada gen *pauA1-7*, frente a la región C-terminal de FluG. La función adscrita de los residuos es la correspondiente a las GS.

FluG	Residuos							Función en las GS
	PauA1	PauA2	PauA3	PauA4	PauA5	PauA6	PauA7	
S481	P58	P50	P54	P58	P28	P54	V42	Extrae el protón del NH ₄ ⁺
E564	E146	E140	E143	E146	E101	E143	E131	Unión M β
E566	E148	E142	E145	E148	E103	E145	E133	Unión M α
E626	E211	E205	E208	E211	E166	E208	E180	Unión M α y NH ₃
E633	E218	E212	E215	E218	E173	E215	E187	Unión M α
H682	H268	H261	H264	H268	H222	H265	H236	Unión M β mediante N
H684	H270	H263	H266	H270	H224	H267	H238	Interacción γ -fosfato ATP
R720	R320	R314	R316	R320	R275	R317	R290	Interacción amida (Glu)
W726	Y326	S320	Y322	Y326	A281	Y323	W296	Extrae protón para formar glutamina y ADP
R739	R338	R332	R334	R338	R293	R335	R308	Polariza γ -fosfato ATP para formar γ -glutamil fosfato
R744	R343	R337	R339	R343	R298	R340	R313	Interacción ATP
E752	E355	E349	E351	E355	E310	E352	E332	Unión M β
438	458	452	454	458	413	455	443	Nº de aminoácidos

El análisis de la conservación de residuos catalíticos demostró claramente que los residuos encargados de la acepción y modificación del amonio no estaban conservados en los genes *pauA1-7* ni en *fluG*. Este resultado, vuelve a indicar que una de las diferencias más notables entre una GS y una enzima que lleva a cabo la γ -glutamilación de un sustrato distinto al amonio reside en la conservación de estos residuos. Al comparar los residuos catalíticos que sustituían tanto al aspartato (D) como al glutamato (E), se pudo observar que en todos los genes *pauA1-6*, el aspartato estaba sustituido por una prolina (P), un aminoácido apolar (a pH fisiológico) alifático, mientras que el glutamato (E) estaba sustituido por una tirosina (Y; cadena lateral hidrofóbica) (*pauA1*, *pauA3*, *pauA4*, *pauA6*), una serina (S; cadena lateral polar sin carga) (*pauA2*) o una alanina (A; cadena lateral hidrofóbica y muy pequeña) (*pauA5*).

Si bien el conjunto de resultados obtenidos reforzó la hipótesis de que la región C-terminal de FluG está más estrechamente relacionada a las enzimas γ -glutamil ligasas de poliaminas, se procedió a investigar en profundidad las propiedades catalíticas de PauA7, detalladas por Ladner et al. (2012), las cuales serán objeto de un tratamiento experimental en el quinto capítulo.

2.5. Los genes homólogos a las dos regiones de FluG están presentes en bacterias, hongos y plantas

La presencia de secuencias de origen procariota identificadas en la secuencia de FluG condujo a un análisis la distribución de esas secuencias en otros organismos. Para ello, se utilizó la herramienta pBLAST, empleando la secuencia proteica de FluG como plantilla. La búsqueda reveló la existencia de homólogos de las dos regiones de FluG en bacterias, hongos y plantas. No obstante, los dos dominios se encontraron dentro del mismo polipéptido en hongos y plantas (Figura 24).



Figura 24. Distribución de secuencias proteicas homólogas de FluG en bacterias, hongos y plantas. Los homólogos de FluG en bacterias se encuentran separados, mientras que, en hongos y planta, muestran la misma disposición que FluG. Los colores representan en **verde** la región amidohidrolasa, en **gris** en 'linker' y en **rojo** la región GSI.

La búsqueda limitada a los homólogos de FluG encontrados en *Aspergilli* desveló la existencia de ortólogos en 14 especies. Estos ortólogos mostraron una media de conservación del 70 ± 4 % con la secuencia de *A. nidulans* (Anexo 13). Por otro lado, se procedió a comprobar si los residuos catalíticos predichos para la región N- y C-terminal de FluG (Tabla del Anexo 7 y Tabla 25, respectivamente) estaban o no conservados en los ortólogos de FluG. Los resultados detallados en el Anexo 14 confirman que los ortólogos de FluG en *Aspergilli* conservan todos los residuos catalíticos en ambas regiones. De la misma forma, se llevó a cabo estudio más detallado sobre especies de hongos en los que se podían encontrar ortólogos de FluG (Anexo 14). En este caso, se pudo confirmar que está presente tanto en hongos divergentes tempranos (no forman conidióforos), como en varias especies de hongos ascomicetos (con especies que tienen conidióforos simples y complejos) y en hongos basidiomicetos (no forman conidióforos).

Por otro lado, se llevó a cabo el mismo procedimiento con el conjunto de las secuencias encontradas en los tres reinos, las cuales se alinearon para analizar la conservación de residuos con funciones antes identificadas. Se elaboró así un mapa de conservación de cada aminoácido para las regiones N- y C-terminal de FluG (Figura 25). Los resultados revelan zonas de alta conservación en bacterias, hongos y plantas. Se comprobó también si los residuos catalíticos predichos para ambas regiones de FluG estaban o no conservados en las secuencias homólogas y se marcó su localización en la Figura 25.

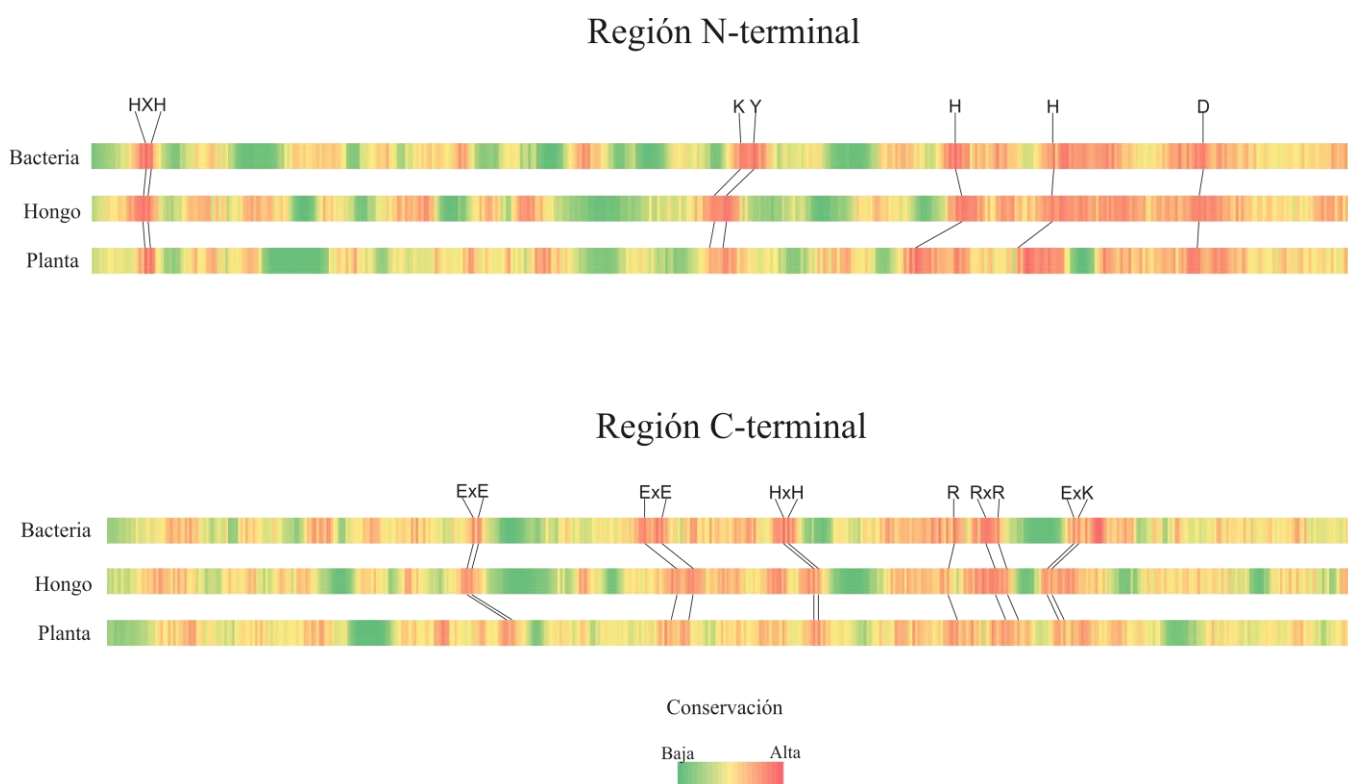


Figura 25. Representación de la conservación de los residuos de los homólogos de FluG en bacterias, hongos y plantas. Las regiones N- y C-terminal están representadas por separado. La conservación de los residuos se indica de menor a mayor en color **verde** y **rojo**, respectivamente. Localización de los residuos catalíticos está indicada mediante líneas que conectan la localización de dichos residuos en cada reino. **H**: Histidina. **K**: Lisina. **Y**: Tirosina. **D**: Aspartato. **E**: Glutamato. **R**: Arginina.

Los resultados obtenidos reflejan que los residuos catalíticos están localizados en zonas de alta conservación (rojas), lo cual demuestra que los homólogos de FluG presentes en bacterias, hongos y plantas tienen estos residuos conservados. De la misma forma, se pudo observar que todos los residuos citados anteriormente para ambas regiones (Tabla del Anexo 7 y Tabla 25) están conservados en todos los *Aspergilli* (Anexo 15).

2.6. Las dos regiones de FluG están presentes en operones de bacterias

En vista de que las dos secuencias en FluG tienen homólogos que se expresan por separado en procariontas, se optó por profundizar en el estudio de la localización de estas secuencias dentro del genoma de bacterias con el objeto de esclarecer si podrían participar en los mismos procesos metabólicos (Mathis et al., 2000). Como primera aproximación, se efectuó una búsqueda de operones bacterianos que al menos incluyesen una GSI y una amidohidrolasa. Una vez identificados, se revisaron también los genes adyacentes Figura 26.

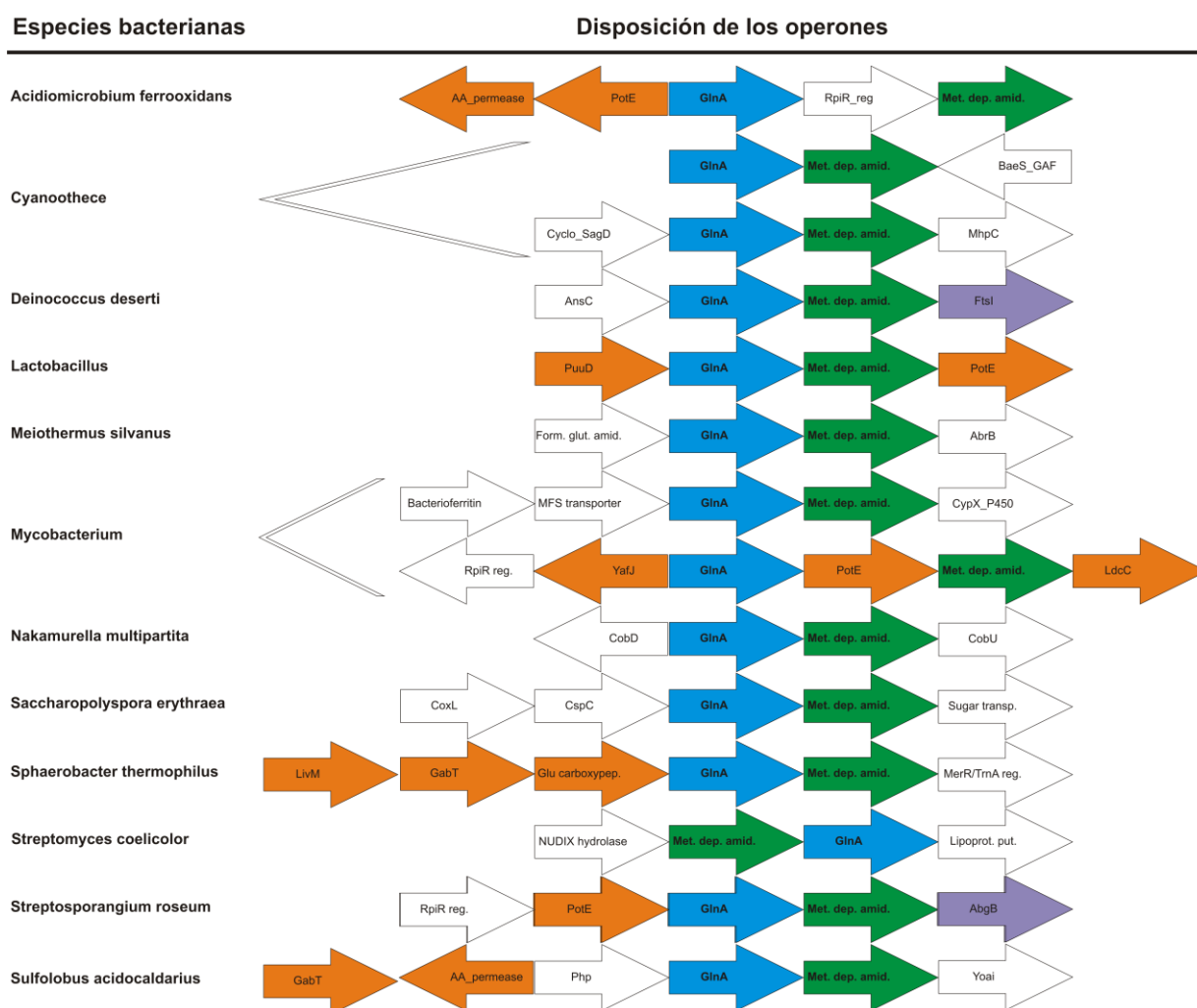


Figura 26. Disposición de los operones que conservan genes homólogos a las regiones N- y C-terminal de FluG. En verde se muestran los genes ortólogos a la región N-terminal de FluG, los cuales codifican predichas amidohidrolasas metalodependientes. En azul se muestran los genes ortólogos a la región C-terminal de FluG, los cuales codifican predichas GSI. En naranja, se muestran genes que están relacionados con el transporte y la degradación de fuentes de nitrógeno. En morado, se muestran genes que están relacionados con la biosíntesis de peptidoglucano y ácido p-Aminobenzóico.

Los resultados de la Figura 26 reflejaron que las secuencias afines a la amidohidrolasa y GSI observadas en el gen *fluG* se encontraban separadas. Si bien todos los homólogos de FluG encontrados en hongos y plantas contenían primero el dominio amidohidrolasa y después el dominio GSI, en bacterias, la gran mayoría de los operones codificaban primero el gen GSI (*GlnA*) y posteriormente la predicha amidohidrolasa (Metal dependent amidohydrolase).

Varios estudios llevados a cabo en *Mycobacterium tuberculosis* (Hayward et al., 2009) y *Streptomyces coelicolor* (Rexer et al., 2006) desvelaron que ambos organismos contienen cuatro genes homólogos a las GSI (*glnA1-4*). En *M. tuberculosis*, la función de la predicha GSI de la Figura 26 corresponde al gen *glnA3* (Strong et al., 2003), cuya función no ha sido descrita. Sin embargo, en *S. coelicolor*, el gen *glnA3* de la Figura 26 tiene una función γ -glutamil putrescina ligasa (Krysenko et al., 2017). En el resto de operones, se observó que varios genes adyacentes podían estar relacionados con procesos de transporte (PotE, LivM, AA_permease) (Kashiwagi et al., 1992) y degradación (PuuD, GabT, LdcC, YafJ) (Kurihara et al., 2006) de distintas fuentes de nitrógeno, así como a la biosíntesis de peptidoglucano (FtsI) (Wissel et al., 2005) y ácido p-Aminobenzoico (AbgB) (Hussein et al., 1998).

3. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo confirman que FluG está formado por dos regiones diferenciadas, unidas por una secuencia de aproximadamente veinte aminoácidos. Si bien estudios anteriores llevados a cabo por (Rexer et al., 2006) y (Lee y Adams, 1994) ya mencionaron que FluG contenía dos dominios con similitud a una amidohidrolasa y una GSI, este estudio ha delimitado la extensión de aminoácidos correspondientes a los dominios amidohidrolasa en la región N-terminal y el dominio GSI en la región C-terminal. Cabe resaltar también que la presencia de dos secuencias PEST en FluG, pueden indicar una vida media celular corta de la proteína (Rechsteiner y Rogers, 1996).

Por un lado, la región N-terminal tiene similitud con una amidohidrolasa de tipo 2, la cual forma parte de una amplia familia de enzimas que comparten características estructurales (Seibert y Raushel, 2005). Además, estas enzimas conservan ligandos metálicos y residuos catalíticamente importantes. Estos residuos comprenden cuatro

histidinas y un aspartato, que actúan como enlaces catalíticos para unirse a uno o dos iones metálicos en los sitios catalíticos (Seibert y Raushel, 2005).

El análisis de este grupo de amidohidrolasas y la búsqueda de cristales homólogos a la región N-terminal, ha permitido identificar los residuos catalíticos conservados en otras secuencias. Este análisis ha desvelado que esta región conserva tres residuos (H20, H22 y D354) cuyo papel es la coordinación del ligando metálico $M\alpha$ (Nguyen et al., 2009; Martinez-Rodriguez et al., 2010). Teniendo en cuenta que los cristales candidatos cumplen distintas funciones enzimáticas, cabe destacar que la conservación de estos tres residuos en todas las estructuras indica la importancia que tienen en este grupo de amidohidrolasas. Por este motivo, estos tres residuos fueron seleccionados como candidatos para ser mutados puntualmente en FluG (siguiente capítulo).

Se ha confirmado que FluG conserva todos los residuos catalíticos correspondientes a amidohidrolasas cíclicas (Nam et al., 2005), como las dihidropirimidinasas (Lohkamp et al., 2006; Hsieh et al., 2013) y las hidantoinasas (Cheon et al., 2002) que participan en la ruta de degradación de las pirimidinas como el uracilo (U) y la timina (T). Estas enzimas, además de tener los tres residuos que se coordinan con el primer ligando metálico $M\alpha$ (H20, H22 y D354), contienen otros dos residuos (H264 y H298) que se coordinan con un segundo ligando metálico $M\beta$, junto con la conservación estructural de una lisina (K192) y una tirosina (Y197) que podrían coordinarse a los dos ligandos ($M\alpha$ y $M\beta$) y unirse al sustrato, respectivamente (Hsieh et al., 2013). Sin embargo, teniendo en cuenta que la estructura de cristal de la dihidropirimidinasa (3DC8), no abarca la totalidad de la región N-terminal FluG, se seleccionó un cristal (2QPX) que, a pesar de no tener información sobre su actividad enzimática, conserva todos los residuos catalíticos correspondientes a una dihidropirimidinasa y exhibe la mejor similitud estructural entre todos los candidatos encontrados para la región N-terminal de FluG. La creación del modelo de la región N-terminal, utilizando 2QPX como molde, ha confirmado que todos los residuos mencionados anteriormente exhiben una conservación estructural semejante a la observada en 2QPX. Este resultado propició la utilización de este candidato para llevar a cabo una sustitución heteróloga de la región N-terminal de FluG en el siguiente capítulo.

La región C-terminal de FluG presenta una clara similitud con una GSI, sin embargo, un análisis detallado reveló que FluG está relacionado con enzimas que catalizan una actividad γ -glutamil ligasa (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Takeo et al., 2013). La búsqueda de cristales homólogos a la región C-terminal, permitió identificar entre varios candidatos que codifican una GSI, un cristal (4HPP, gen PA5508) que codifica una γ -glutamil ligasa específica de aminas aromáticas (Ladner et al., 2012). Los residuos que actúan sobre la unión del metal y la orientación del glutamato generalmente se conservan entre las enzimas GSI y las γ -glutamil ligasas (Ladner et al., 2012), como se ha podido confirmar en FluG en este trabajo. De la misma forma, la conservación de los residuos que se unen a los metales, invita a postular que los inhibidores de las GS (PPQ, P3S) puedan también afectar a la función de FluG. Sin embargo, la mayor diferencia entre las enzimas GSI y las γ -glutamil ligasas reside en la interacción entre dos residuos (un glutamato y un aspartato) que protegen el intermediario γ -glutamil fosfato y eliminan un protón de la molécula de amonio (formando amoniaco) para propiciar la sustitución por el fosfato en el γ -glutamil fosfato (Murray et al., 2013). En este estudio, se ha podido confirmar que estos residuos no están conservados en las secuencias de las γ -glutamil ligasas, la región C-terminal y aquellos homólogos de las GSI que no catalizan la síntesis de glutamina (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Krysenko et al., 2017). Para llevar a cabo una prueba experimental que aclare este punto, se han seleccionado una serie de residuos para llevar a cabo mutaciones puntuales en el siguiente capítulo, con el objetivo de determinar su importancia en la actividad de la región C-terminal de FluG.

En la búsqueda llevada a cabo para la selección de residuos catalíticos y genes candidatos para sustituir ambas regiones de FluG, se pudo encontrar más información en torno a la función que llevan a cabo los homólogos que mostraron tener una buena similitud estructural con la región C-terminal de FluG. Los informes del gen PA5508 han asociado su actividad con la ruta de utilización de las poliaminas junto con otros seis genes parálogos en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, siendo este gen el único que no se inducía en presencia de sustratos de poliaminas (Yao et al., 2011). Investigaciones posteriores realizadas por Ladner et al. (2012) mostraron que la preferencia del sustrato de PA5508 era más fuerte para las aminas aromáticas (catecolaminas) que para las aminas lineales (poliaminas). La comparación llevada a cabo entre las siete secuencias PauA1-7 y la región C-terminal de FluG ha mostrado que tanto la secuencia PauA7 como esta

región, conservan una menor identidad en comparación con los PauA1-6. Este resultado puede indicar que el papel enzimático de FluG pueda estar más estrechamente relacionado al de una γ -glutamyl ligasa con preferencia para las aminas aromáticas, que a una γ -glutamyl ligasa con preferencia para aminas lineales como la putrescina.

Teniendo en cuenta que los informes sobre la función de los homólogos de FluG se ha descrito en bacterias, otro de los aspectos que suscitó interés fue saber en qué especies se pueden encontrar sus homólogos. De esta forma, se confirmó que existen secuencias homólogas a las dos regiones de FluG en bacterias (Strong et al., 2003; Rexer et al., 2006), hongos (Schumacher et al., 2015; Li et al., 2017; Chen et al., 2020) y plantas (Mathis et al., 1999; Trevaskis et al., 2002; Doskočilová et al., 2011; Silva et al., 2015), sin embargo, en bacterias, estas regiones se encuentran por separado. Cabe resaltar también que, en los tres reinos, todas las secuencias homólogas a FluG conservan todos los residuos catalíticos que se han detallado en este capítulo. Este hecho podría sugerir que FluG pueda cumplir el mismo papel en hongos y plantas. Sin embargo, basándonos en la caracterización de los homólogos de FluG en otros *Aspergilli* (Mah y Yu, 2006; Ogawa et al., 2010; Chang et al., 2012; Wang et al., 2015), no se puede afirmar que el papel de γ -glutamyl ligasa que se le ha adscrito a FluG se haya conservado en los diferentes reinos, más aún teniendo en cuenta que ambas regiones se encuentran por separado en bacterias.

Con respecto a las predicciones que han adscrito a FluG actividades de dos enzimas de origen procariota, se ha atribuido a eventos de fusión y fisión impulsados por la evolución paráloga de bacterias a hongos (Mathis et al., 2000), como ha podido ocurrir con los homólogos de FluG en bacteria. Cabe destacar que este hecho también puede darse entre diferentes especies de hongos mediante translocación o inversión cromosómica (Leonard y Richards, 2012). En este caso, se ha confirmado que los homólogos bacterianos de FluG se encuentran organizados en operones, cuyo papel es, generalmente, desconocido. En el caso de los operones encontrados en *Mycobacterium tuberculosis*) y *Streptomyces coelicolor*, se ha observado que ambos organismos contienen cuatro genes homólogos a las GSI (*glnA1-4*) (Rexer et al., 2006; Hayward et al., 2009), de los cuales *glnA3* (Strong et al., 2003; Rexer et al., 2006) es el que está presente en ambos operones. La generación del nulo del gen *glnA3* de *Streptomyces coelicolor* no exhibió defectos en la esporulación, demostrando que el papel de este gen es distinto al de la región C-terminal FluG (Rexer et al., 2006). Un estudio posterior

llevado a cabo por Krysenko et al. (2017) desveló que el gen *glnA3* tiene actividad γ -glutamil putrescina ligasa, la cual está implicada en la ruta de degradación de las poliaminas y su posterior utilización como fuente de nitrógeno (Kurihara et al., 2008). Se desconoce que papel puede tener el gen adyacente que codifica la amidohidrolasa en estas bacterias, pero la disposición cercana entre las secuencias predichas de GSI y amidohidrolasa, indica posiblemente una conexión funcional (Strong et al., 2003; Iyer et al., 2009).

La información obtenida en este capítulo ha permitido, por un lado, seleccionar los residuos catalíticos candidatos a ser mutados puntualmente para poder determinar su importancia en la función de FluG. Por otro lado, se llevará a cabo la separación de las regiones N- y C-terminal de FluG y se expresaran individualmente y por separado dentro del hongo, con el objetivo de verificar la función que cumple cada uno. Finalmente, se sustituirán las dos regiones de FluG por uno de los candidatos bacterianos que se han utilizado para el modelado de FluG, para comprobar si estos homólogos son capaces de llevar a cabo *in vivo* la función nativa de FluG.

CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE FLUG

1. Introducción

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior ofrecen una perspectiva más completa sobre las posibles funciones de FluG en el desarrollo asexual. En primer lugar, quedó demostrado que la proteína consta de dos regiones diferenciadas, unidas por una secuencia de aminoácidos, para la cual no se predice ninguna función, más allá de la unión de ambas regiones. Estas dos regiones tenían similitud con una amidohidrolasa (región N-terminal) y una GSI (región C-terminal) de origen procariota. Estos antecedentes revelan que todavía queda pendiente una caracterización en la que ambas regiones de FluG se expresen individualmente, y se analice su papel en el desarrollo del hongo.

En este capítulo se llevarán a cabo las deleciones de cada región, mutaciones puntuales de los predichos residuos catalíticos y las sustituciones de ambas regiones por sus homólogos bacterianos, con el objetivo de determinar la importancia y la función de la región N-terminal y la región C-terminal.

2. Resultados

2.1. Las regiones N- y C-terminal de FluG cumplen distintas funciones

Cada una de las dos regiones de FluG se expresó por separado bajo el control del promotor nativo con el objeto de verificar su papel en el desarrollo asexual. Así mismo, se expresaron simultáneamente, pero por separado para verificar si ambas regiones debían estar unidas para llevar a cabo su función. Los resultados de la caracterización fenotípica se pueden observar en la Figura 27.

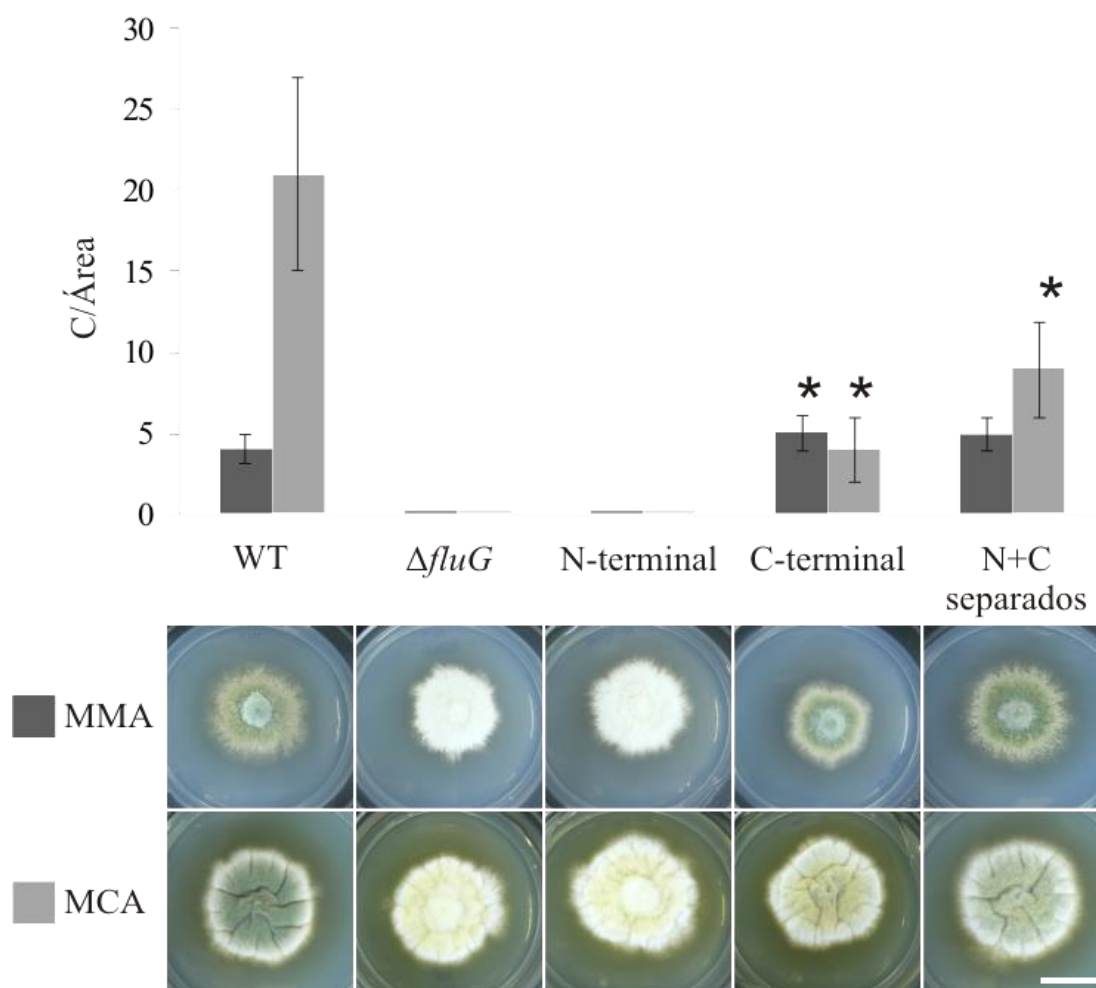


Figura 27. Fenotipos y ratios de C/Área (millones/cm²) de todos los mutantes FluG, tras haberlos incubado durante 72 h. Cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* ($\Delta fluG$), N-terminal (aa1–aa406), C-terminal (aa427–aa865) y regiones N y C-terminales separadas (N+C separados) mutantes en MMA y MCA. Los valores C que son estadísticamente diferentes (valor P <0,05) al WT (*) y el $\Delta fluG$ (#) están marcados. Los valores de C/Área en medio mínimo (MMA) están representados en gris oscuro, y los valores de C/Área en medio Completo (MCA) están representados en gris claro. Barra de escala = 1 cm

Los valores de la caracterización se reflejan, por un lado, como el valor $C/\text{Área}$ (referido como C), el cual indica la cantidad de esporas producidas en la colonia por unidad de área, y los valores están reflejados en el Anexo 16. Por otro lado, se midieron también los valores de peso seco de la colonia reflejados como $\text{DCM}/\text{Área}$ (Dry Cell Mass; referido como DCM) por unidad de área (Anexo 16). Una vez analizados los resultados, de C y DCM, se determinó que el valor C era el más representativo para analizar las diferencias fenotípicas de todos los mutantes que se estudiaron en este capítulo.

Los resultados mostrados en la Figura 27 indican que, en MCA, la cepa silvestre muestra un valor C cinco veces superior al obtenido en MMA. Teniendo en cuenta que la diferencia entre ambos medios es la adición de extracto de levadura en el MCA, se supuso que el cambio observado se debe a la disponibilidad de nutrientes en el medio. La cepa que expresó exclusivamente la región N-terminal, presentó un valor de C similar al del mutante $\Delta fluG$ en MMA, mientras que, en medio completo, aun siendo valores muy pequeños, la producción de conidias era ligeramente superior en MCA. Estos resultados indican que la región C-terminal es necesaria para llevar a cabo la función principal de la proteína en el desarrollo asexual.

Por otro lado, el mutante que expresó solo la región C-terminal presentó un valor C comparable al de la cepa WT en MMA, mientras que, en MCA, fue una quinta parte del valor C del WT. Estos resultados indican que, si bien la región C-terminal fue capaz de cumplir el papel del polipéptido FluG completo en MMA, la ausencia de la región N-terminal limitó su eficacia, sobre todo en MCA, donde la disponibilidad de nutrientes es muy superior. De la misma forma, cabe destacar que el valor C obtenido en la cepa C-terminal en MCA, es menor que el observado en MMA. En resumen, estas observaciones parecen indicar que la región C-terminal realiza la función principal de la proteína en el desarrollo asexual, pero la región N-terminal puede proporcionar una función de apoyo muy significativa en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes.

Con el objeto de verificar la importancia que tiene la presencia de las dos regiones de FluG unidas por el 'linker', se analizó una cepa que expresaba ambas regiones como dos polipéptidos separados, cada uno bajo el control del promotor nativo de *fluG* (N + C separado) (Figura 27). El valor de C registrado en MMA fue similar al registrado para las cepas WT y C-terminal. En MCA, sin embargo, el nivel de conidiación se situó en un

valor intermedio (Anexo 16). Estos resultados indican que ambas regiones son funcionales cuando se expresan por separado, ya que, por un lado, en MMA se midieron niveles de conidiación semejantes a los observados en las cepas WT y C-terminal. Por otro lado, en MCA, el valor de C duplicó el obtenido en la cepa C-terminal, sin embargo, este valor representaba la mitad del valor de C obtenido en la cepa WT. En resumen, se confirmó que la región N-terminal tiene un papel de apoyo a la región C-terminal en la producción de conidias en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes, especialmente, cuando ambas regiones se expresan en el mismo polipéptido.

2.2. La expresión por separado de las regiones N- y C-terminal de FluG afecta al desarrollo sexual

Los resultados obtenidos en el apartado anterior demostraron que al menos, en el desarrollo asexual, las regiones N- y C-terminal cumplen funciones distintas, dependiendo de la condición del medio en el que es cultivado el hongo. Teniendo en cuenta los antecedentes y los resultados recogidos en la Figura 28 del primer objetivo, se procedió al conteo de cleistotecios de los mutantes que contenían las regiones N- y C-terminal de FluG (Figura 28). Los valores del conteo de cleistotecios están detallados en el (Anexo 17).

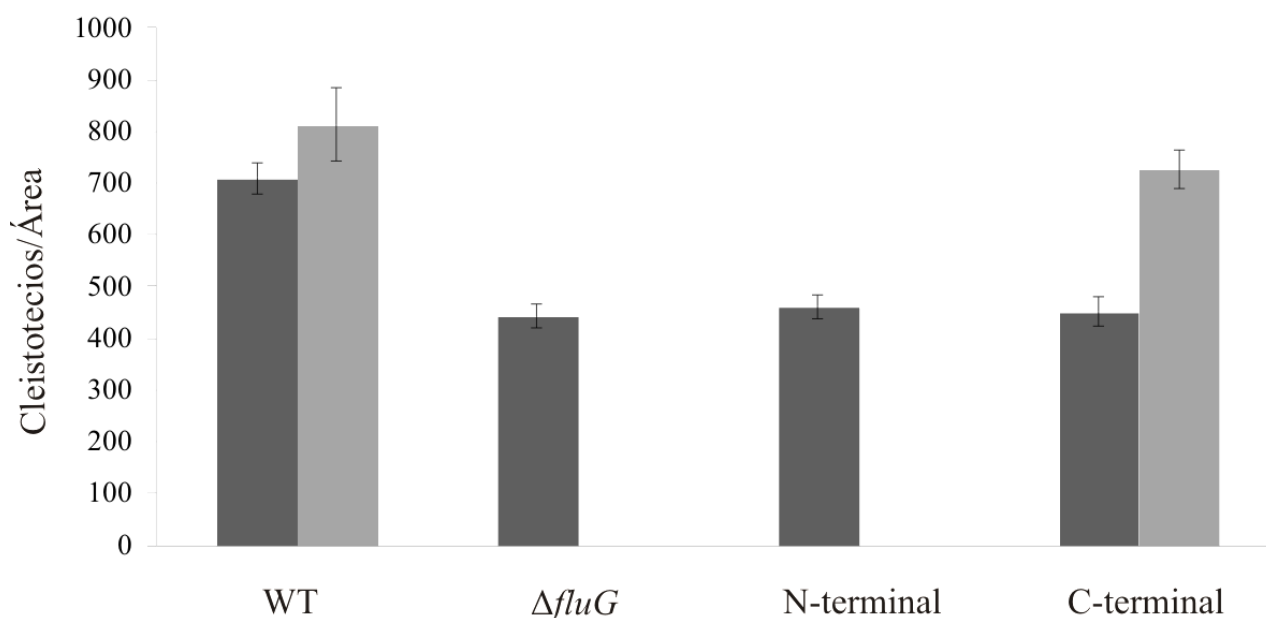


Figura 28. Contaje de cleistotecios por unidad de área (Cleistotecios/Área) en una cepa WT, $\Delta fluG$, N-terminal (aa1–aa406), C-terminal (aa427–aa865) en MMA (gris oscuro) y MCA (gris claro).

Los resultados muestran que en medio mínimo la producción de cleistotecios por unidad de área en los mutantes N- y C-terminal es semejante al de una cepa *AfluG*. En medio completo, la cepa que expresa la región N-terminal no desarrolla ninguna estructura sexual. Sin embargo, en las mismas condiciones, el mutante que contiene la región C-terminal genera la misma cantidad de cleistotecios que una cepa silvestre. Los resultados demuestran que el número más alto de cleistotecios en ambos medios se consigue cuando ambas regiones están presentes. La región C-terminal es esencial para que se lleve a cabo el desarrollo sexual en medio completo.

2.3. La sustitución de los residuos conservados afecta a la función de FluG

Las mutaciones sobre los residuos equivalentes a H20, H22 y D354 en la región N-terminal de FluG (Figura 22) habían sido descritas como esenciales para la actividad de amidohidrolasas (Kim y Kim, 1998; Li et al., 2006; Lohkamp et al., 2006; Nguyen et al., 2009). Con el objeto de probar el efecto de sustituciones en esos mismos residuos sobre la función de FluG, se construyeron tres mutantes en los que se sustituyeron los aminoácidos por una alanina: simple (D354), doble (H20-H22) y triple (H20-H22-D354). La misma estrategia se siguió para la región C-terminal, donde los residuos E566, E626, H682, R720, R739, R744 y E752 se seleccionaron en base a trabajos anteriores (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Murray et al., 2013). Ninguna de estas sustituciones dio lugar a la predicción de cambios conformacionales importantes cuando se testaron frente a modelos de homología (Materiales y Métodos, Maestro (Schrödinger®)). Los fenotipos observados para el conjunto de los mutantes se muestran en la Figura 29 (Se incluye en mayor tamaño en el Anexo 18). Los valores de producción de conidias y el peso seco por unidad de área están detalladas en el Anexo 16.

Todas las mutaciones en la región N-terminal exhibieron valores de C más bajos con respecto a la cepa WT en ambos medios. En MMA, fueron ligeramente inferiores. En MCA, sin embargo, se observaron diferencias notables. Por un lado, el mutante H20A-H22A presentó un nivel de conidiación superior al mutante D354A, y este, a su vez, superó al mutante triple (H20A-H22A-D354A) (Figura 29). Esto indica un efecto aditivo de las mutaciones.

En la región C-terminal, las mutaciones en los residuos E566, E626, H682, R720, R739, R744 y E752 derivaron en cambios drásticos. En MMA, todas las cepas mutantes

presentaron valores de C más bajos en comparación con la cepa silvestre, pero a su vez, superiores a los obtenidos en la cepa *ΔfluG*. Esto indica que las mutaciones puntuales resultaron en una inactivación parcial de la actividad. En MCA, los valores de C fueron muy bajos, acercándose a los obtenidos en la cepa *ΔfluG*. Sin embargo, el mutante R739A presentó un fenotipo divergente con valores de C estadísticamente superiores en MCA en comparación a los otros mutantes de esta región (Figura 29).

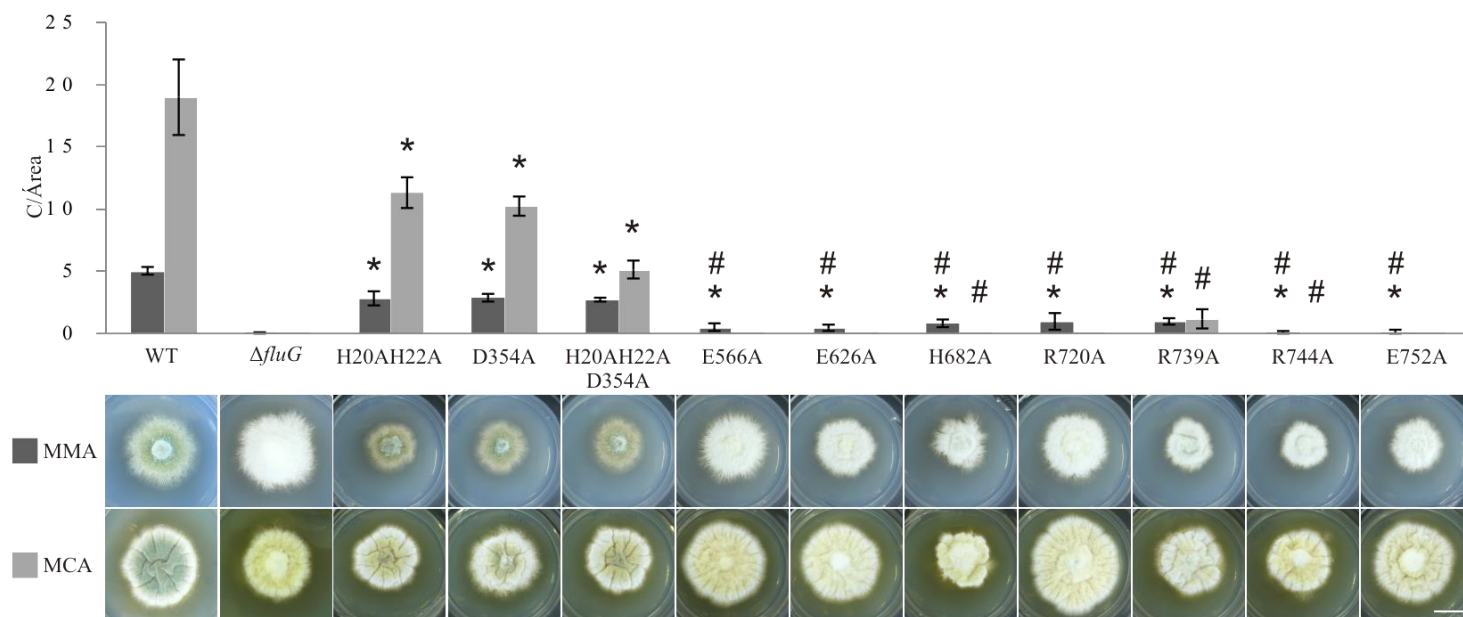


Figura 29. Fenotipos y ratios de C/Área (millones/cm²) de todos los mutantes FluG, tras haberlos incubado durante 72 h. Cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* (*ΔfluG*) y los mutantes puntuales de ambas regiones en MMA y MCA. Los valores C/Área que son estadísticamente diferentes (valor P <0,05) al WT (*) y el *ΔfluG* (#) están marcados. Los valores de C/Área en medio mínimo (MMA) están representados en gris oscuro, y los valores de C/Área en medio completo (MCA), están representados en gris claro. Barra de escala = 1 cm

En conjunto, los resultados muestran que las mutaciones puntuales en ambas regiones afectan a la función biológica atribuible a cada una de las regiones, confirmando la funcionalidad de los residuos conservados en cada una de ellas.

2.4. Niveles de expresión del gen *fluG* en distintos mutantes

Para determinar que los fenotipos observados no eran producto de una expresión génica alterada, las cepas fueron examinadas por qPCR y comparadas con la de la cepa WT, como se muestra en la Figura 30 (Se incluye en mayor tamaño en el Anexo 19). Con la excepción del mutante *ΔfluG*, todos mutantes presentaron niveles de transcripción iguales o superiores a los observados en la cepa WT. La cuantificación de la expresión de *fluG* en todos los mutantes indicó que el nivel de expresión era superior al observado en

la cepa WT en la mayoría de ellos. Teniendo en cuenta que las mutaciones causaron una funcionalidad aminorada en términos fenotípicos, estos niveles de expresión descartan que los fenotipos observados se deban a niveles de expresión reducidos. Estos resultados sugieren que la regulación de FluG pueda estar condicionada por el nivel de actividad que esté llevando a cabo, siendo su ausencia una señal para que aumente la expresión de *fluG*.

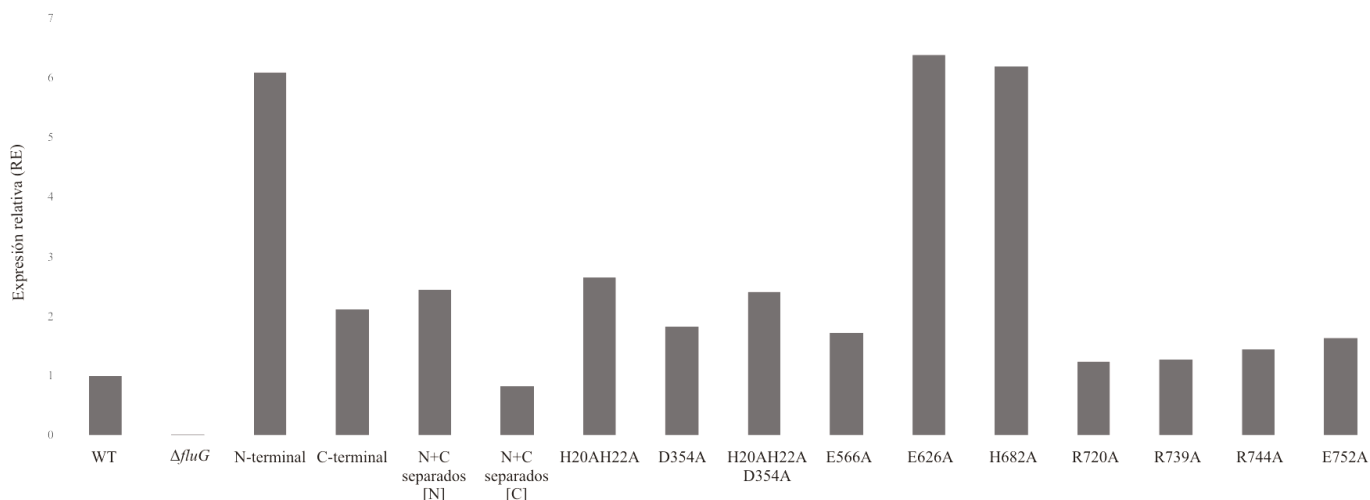


Figura 30. Los valores de expresión de *fluG* para cada cepa en MMA se muestran en el gráfico. Todas las muestras fueron tomadas después de 18 h de crecimiento vegetativo. Las siglas se refieren a lo siguiente: WT, cepa silvestre; $\Delta fluG$, mutante nulo del gen *fluG*; N-terminal, región (1-406); C-terminal, región (427-865); N + C separados [N] y N + C separados [C], mutante de región separada N- y C-terminal; H20A-H22A / D354A / H20A-H22A-D354A, mutantes puntuales de la región N-terminal; E566A / E626A / H682A / R720A / R739A / R744A / E752A, mutantes puntuales de la región C-terminal.

2.5. La sustitución heteróloga de ambas regiones de FluG por sus homólogos bacterianos complementan su función

Apoyados por las homologías estructurales observadas entre las regiones N- y C-terminal con las de *Lactobacillus paracasei* (LSEI_0440) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA5508), respectivamente, se construyeron cepas en las que las secuencias bacterianas se expresaron bajo el promotor nativo de *fluG* en combinaciones que incluían tres quimeras proteicas (LSEI_0440+C-terminal; N-terminal+PA5508; LSEI_0440+PA5508) y un único polipéptido (PA5508).

Los fenotipos de las cepas mutantes se muestran en la Figura 31. Los valores de C obtenidos en las cepas LSEI_0440+C-terminal y N-terminal+PA5508 fueron significativamente más altos que la cepa WT en MMA. En las mismas condiciones, el PA5508 y el LSEI_0440+PA5508 mostraron valores de C estadísticamente similares en comparación con la cepa WT. Por otro lado, los valores de C de las tres quimeras de proteínas (LSEI_0440+C-terminal; N-terminal+PA5508; LSEI_0440+PA5508) fueron estadísticamente similares a la cepa WT en MCA. Sin embargo, la cepa que expresaba el polipéptido PA5508 solo exhibió un valor significativamente más bajo en comparación con el WT en el mismo medio.

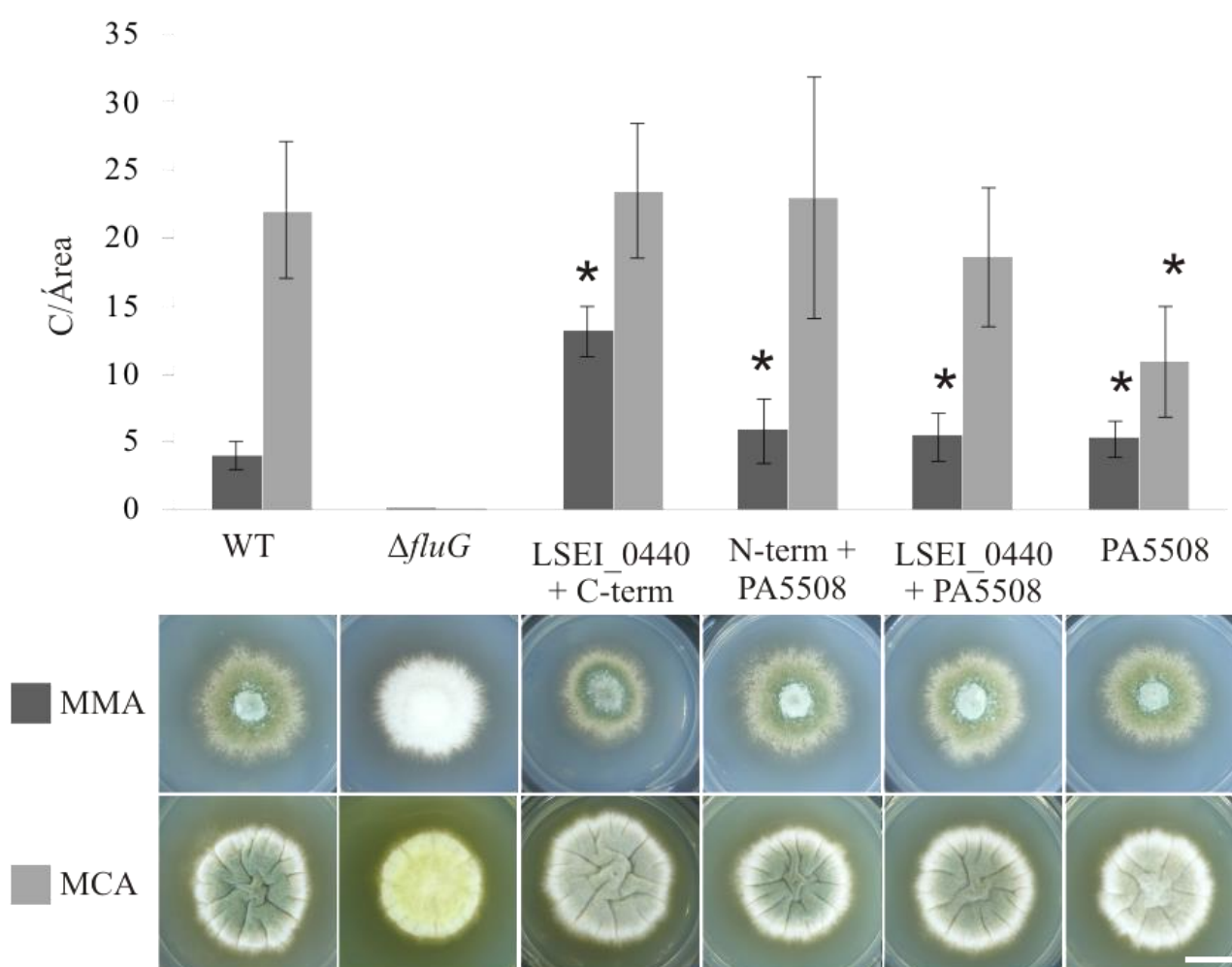


Figura 31. Fenotipos y ratios de C/Área (millones/cm²) de todos los mutantes de sustitución de FluG, tras haberlos incubado durante 72 h. Cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* ($\Delta fluG$) y los mutantes de sustituciones heterólogas LSEI_0440+C-terminal (FluG), N-terminal (FluG)+PA5508, LSEI_0440+PA5508 y PA5508 solo en MMA y MCA. Los valores C/Área que son estadísticamente diferentes (valor P <0,05) al WT (*) y el $\Delta fluG$ (#) están marcados. Los valores de C/Área en medio mínimo (MMA) están representados en gris oscuro, y los valores de C/Área en medio completo (MCA), están representados en gris claro. Barra de escala = 1 cm

Los resultados demuestran que la proteína codificada por el gen LSEI_0440 puede reemplazar funcionalmente la región N-terminal de FluG. Por otra parte, la proteína codificada por PA5508 cumple el papel de la región C-terminal de FluG, ya sea como un solo polipéptido (mutante PA5508), o fusionada a la región N-terminal de FluG (quimera N-terminal+PA5508). De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, el hecho de que la quimera que expresa la proteína fusionada de LSEI_440 y PA5508 exhiba un fenotipo estadísticamente comparable a una cepa WT confirma que ambas enzimas bacterianas pueden funcionar conjuntamente para reemplazar a ambas regiones FluG.

2.6. La sustitución heteróloga de FluG por su homólogo de planta, NodGS, no complementa su función

Siguiendo la misma estrategia que se llevó a cabo con los homólogos bacterianos, se construyó una cepa que contenía la secuencia del gen NodGS de *Arabidopsis thaliana* la cual se expresó bajo el promotor nativo de *fluG*. Los fenotipos tanto de la cepa mutante, como la cepa silvestre y se muestran en la Figura 32.

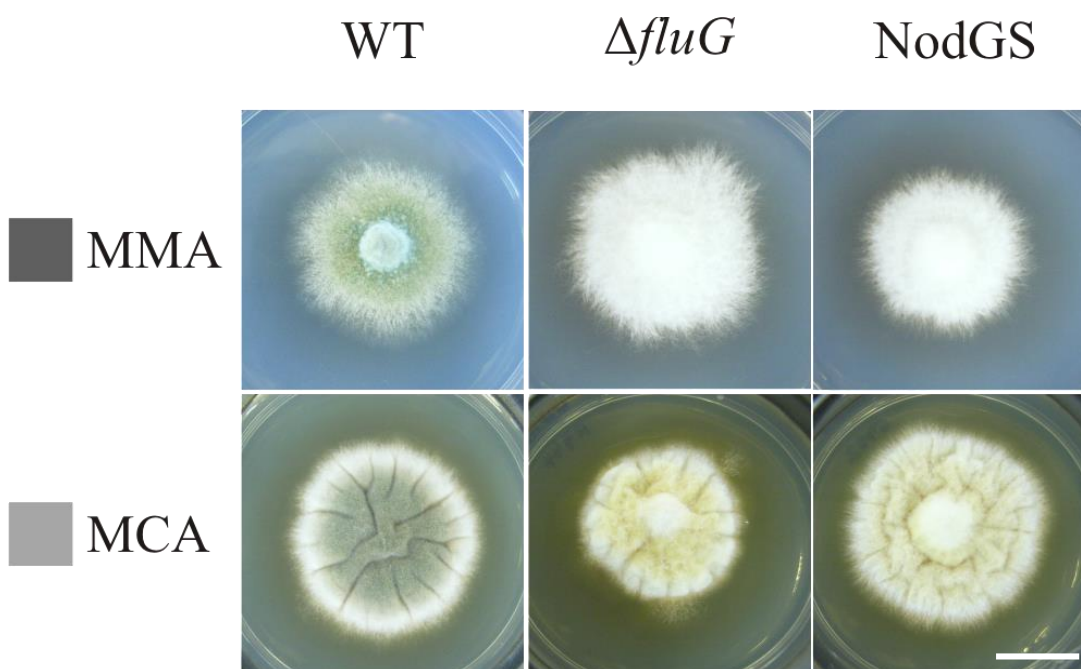


Figura 32. Fenotipo de la cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* ($\Delta fluG$) y el mutante NodGS, tras haberlo incubado durante 72 h. Cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* ($\Delta fluG$) y el mutante NodGS. Barra de escala = 1 cm

Los resultados observados demuestran que NodGS no es capaz de complementar la función de FluG, ya que los fenotipos obtenidos en el mutante NodGS, es similar a los obtenidos en un mutante nulo del gen *fluG*.

2.7. Precisiones sobre la actividad enzimática de la región C-terminal

Tras la demostración de la capacidad de la secuencia 4HPP para suplantar la función de la región C-terminal, se consideró oportuno realizar un examen más detallado de la secuencia y estructura de esta enzima. El trabajo llevado a cabo por Ladner et al. (2012) tenía como objetivo la identificación de las diferencias más notables entre una GS y los genes que son homólogos a las GS, pero no comparten dicha función como es el caso de los genes *pauA1-7*. Teniendo en cuenta que a los genes *pauA1-6* ya se les asignó un papel en la degradación de poliaminas en estudios anteriores (Lu et al., 2002; Chou et al., 2008; Yao et al., 2011; Yao et al., 2012), su investigación se centró en llevar a cabo una evaluación estructural y bioquímica del gen *pauA7* (PA5508). El estudio bioquímico desveló que esta enzima no exhibía la actividad de una GS porque era incapaz de formar glutamina. Sin embargo, mostraba una actividad γ -glutamil ligasa con preferencia por sustratos como las aminas heterocíclicas o catecolaminas, tales como la tryptamina, serotonina y la dopamina (Ladner et al., 2012).

2.7.1. El extremo C-terminal tiene mayor similitud con una γ -glutamil ligasa

La resolución del cristal de la proteína PA5508, aforó una serie de diferencias estructurales en comparación con la estructura de cristal de la GS de *Salmonella typhimurium* (1FPY). Por un lado, se resaltaba que mientras la GS de *S. typhimurium* adopta un estado oligomérico de dos hexámeros coordinados por el extremo C-terminal de la proteína (también conocido como correa helicoidal) para formar un dodecámero, la proteína PauA7 formaba hexámeros, debido a que el extremo C-terminal se pliega hacia el interior de la proteína, quedando inaccesible para cualquier tipo de interacción (Figura 33). Ladner et al. (2012) relacionaron este fenómeno con la ausencia de una región de aproximadamente 55 aminoácidos presente en la GS de *Salmonella typhimurium*, la cual forma dos láminas beta que impiden el plegamiento del extremo C-terminal. En la estructura de PauA7 se observó que esta región estaba formada por aproximadamente 12 aminoácidos sin estructura, siendo esta la razón por la que el extremo C-terminal puede tener acceso al plegamiento hacia el interior de la proteína (Figura 33).

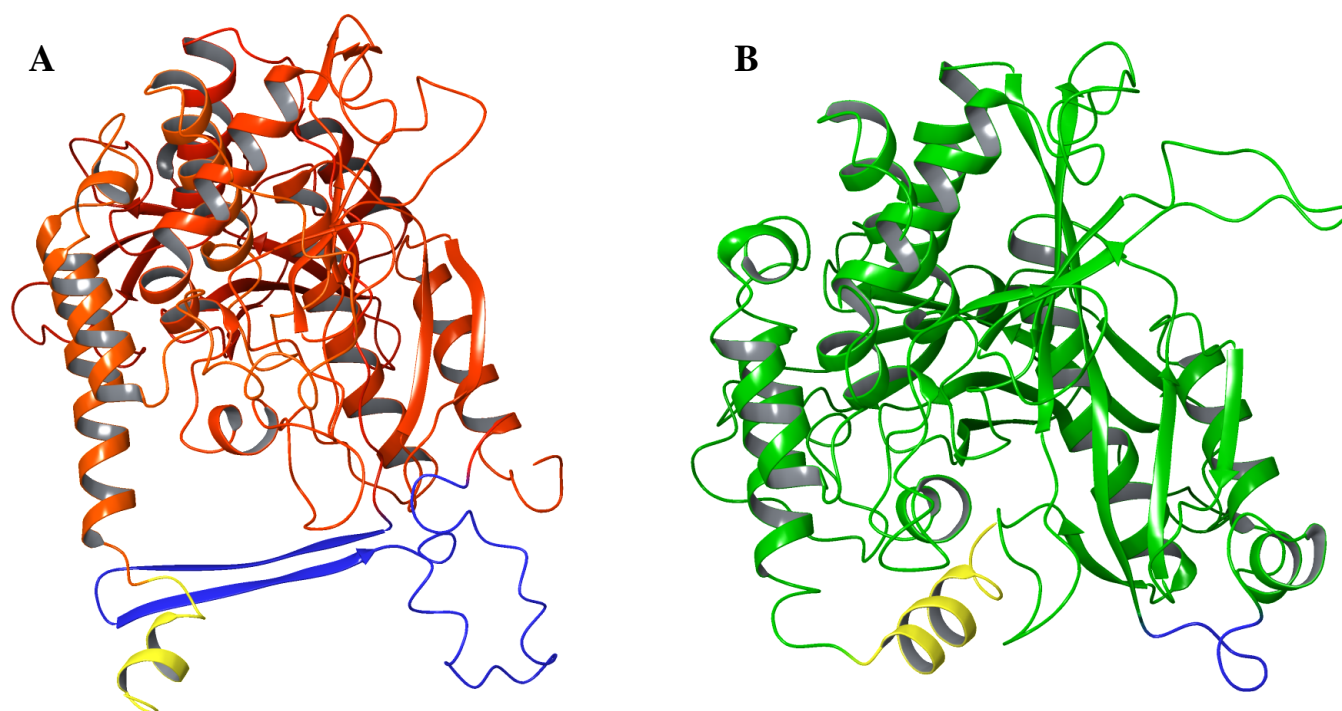


Figura 33. Representación de la conformación que adopta el extremo C-terminal (**amarillo**) y la región de las dos láminas beta (**azul**) en los cristales 1FPY (**rojo**) y 4HPP (**verde**). **A)** En el cristal 1FPY, el extremo C-terminal está orientado hacia el exterior, quedando accesible para interactuar con otra subunidad. Las dos láminas beta bloquean la movilidad del extremo C-terminal. **B)** En el cristal 4HPP, debido a la ausencia de las dos láminas beta, el extremo C-terminal queda se pliega hacia el interior de la proteína, quedando inaccesible para cualquier tipo de interacción.

Teniendo en cuenta estos indicios, se procedió a analizar cual de los modelos del extremo C-terminal de las dos proteínas modelo (1FPY o 4HPP) guardan mayor similitud estructural con el extremo C-terminal de FluG, valiéndonos para ello de los valores QMEAN que la herramienta Swiss-Model calcula por cada aminoácido. Así mismo, se procedió también a analizar la región en la que Ladner et al. (2012) observaron la ausencia de dos láminas beta (Figura 33), para poder determinar si esta región que FluG contiene los aminoácidos necesarios para formar esta estructura en el cristal 1FPY. Los resultados obtenidos se representan en forma de modelos de FluG obtenidos con el cristal 1FPY (Figura 34) y el cristal 4HPP (Figura 35), junto con un resumen en la Tabla A y la Tabla B del Anexo 20.

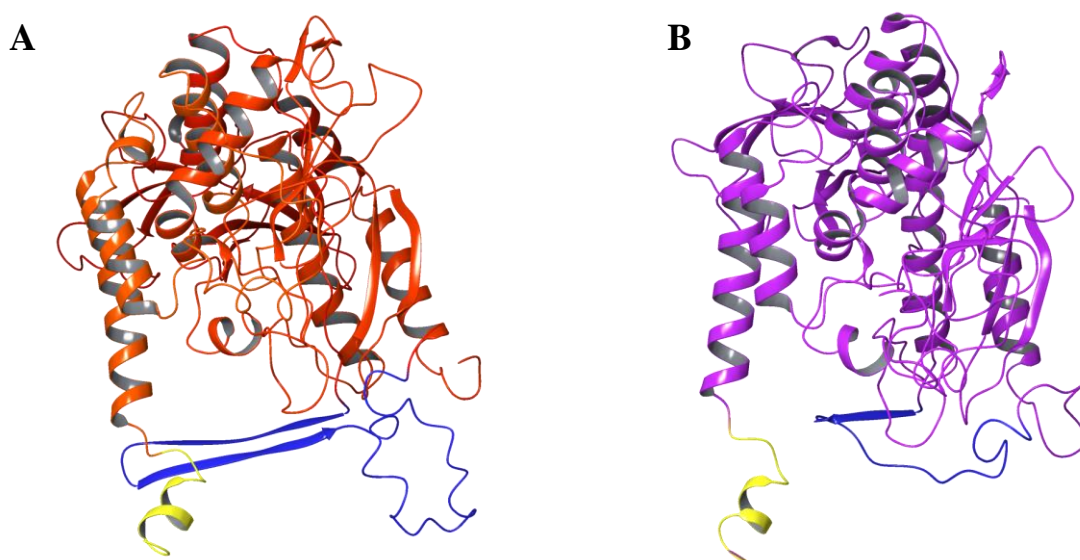


Figura 34. Conformación que adopta el extremo C-terminal (**amarillo**) y la región de las dos láminas beta (**azul**) en los modelos 1FPY (**rojo**) y la región C-terminal modelada con el cristal 1FPY (**morado**). **A)** En el cristal 1FPY, el extremo C-terminal está orientado hacia el exterior, quedando accesible para interactuar con otra subunidad. Las dos láminas beta bloquean la movilidad del extremo C-terminal. **B)** En el modelo de la región C-terminal, debido a la ausencia de las dos láminas beta, el extremo C-terminal puede plegarse hacia el interior de la proteína.

Tras analizar los resultados obtenidos en la Tabla A del Anexo 20, el promedio de los valores QMEAN individuales obtenido para los trece aminoácidos que pueden formar la correa helicoidal sugiere que la estructura que adopta la proteína PauA7 en el cristal 4HPP es la que mayor similitud estructural presenta para esta región de FluG, ya que los valores QMEAN que presenta FluG son superiores para esta conformación. Cuando se comparó la región que está formada por dos láminas beta en el cristal 1FPY con la proteína PauA7 y con FluG, los resultados obtenidos en la Tabla B del Anexo 20

mostraron que ambas proteínas carecen de los aminoácidos necesarios para formar la estructura compuesta por dos láminas beta. Si bien FluG contiene 11 aminoácidos más que PauA7 en esta región, el modelo de FluG construido con el cristal 1FPY demostró que FluG no formaba una estructura semejante a las láminas beta (mostradas en azul) presentes en la GS de *S. typhimurium* (Figura 34).

Por otro lado, el modelo de FluG construido con el cristal 4HPP, demostró que FluG, si bien se extendía 10 aminoácidos más que en modelo 4HPP, esta región conservaba una mayor similitud con la γ -glutamil ligasa de *P. aeruginosa* (Figura 35).

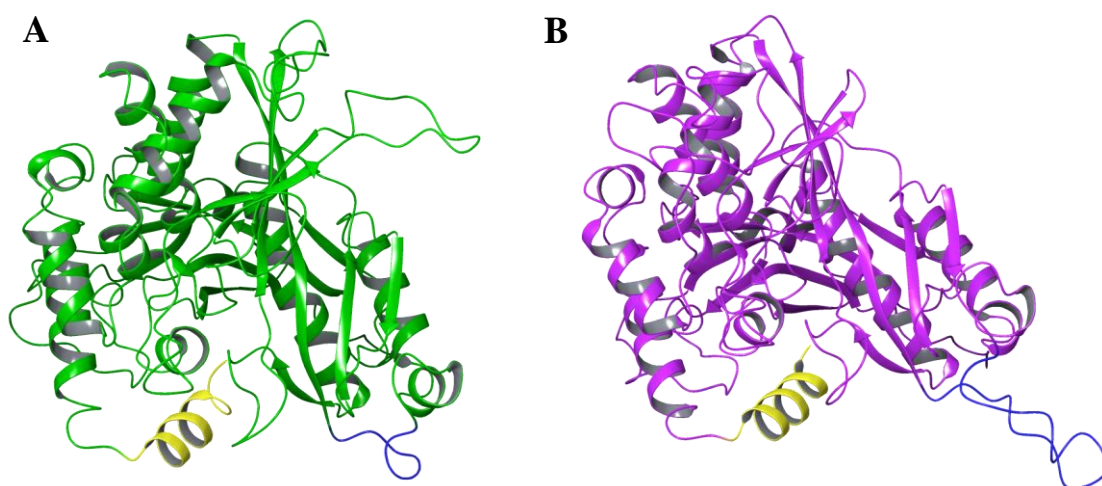


Figura 35. Conformación que adopta el extremo C-terminal (**amarillo**) y la región de las dos láminas beta (**azul**) en los modelos 4HPP (**verde**) y la región C-terminal modelada con el cristal 4HPP (**morado**). **A)** En el cristal 4HPP, debido a la ausencia de las dos láminas beta, el extremo C-terminal queda se pliega hacia el interior de la proteína, quedando inaccesible para cualquier tipo de interacción. **B)** En la región C-terminal, tampoco están presentes las dos láminas beta, y el extremo C-terminal puede plegarse hacia el interior de la proteína.

2.7.2. El dominio β -Grasp de FluG es similar al de ambas GS y γ -glutamil ligasas

Otra característica estructural importante de las GS reside en el extremo N-terminal, el cual adopta una estructura de seis laminas beta (de las cuales, cuatro están interlineadas), también conocido como β -Grasp, tal y como se muestra en la Figura 36. Esta región es especialmente importante porque conserva el residuo catalítico aspartato el cual extrae el protón del amonio, y también porque una vez la proteína se coordina para formar un hexámero, el β -Grasp interacciona con la región C-terminal (catalítica) de la unidad adyacente (Figura 36).

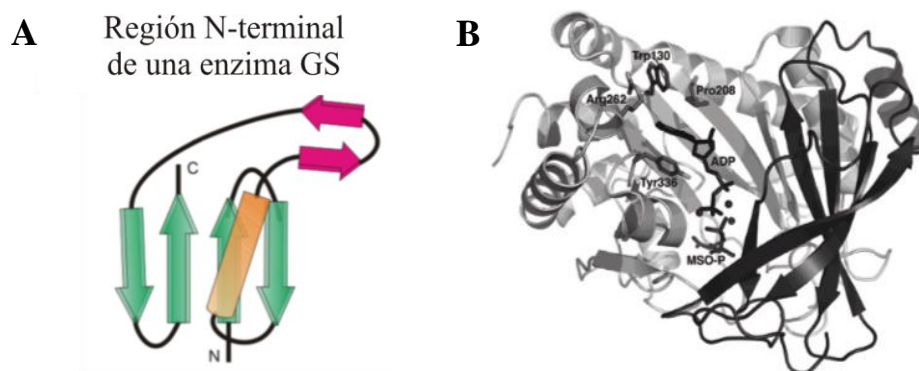


Figura 36. Representación del dominio β -Grasp. **A)** Ilustración de las seis láminas beta que forman el dominio β -Grasp. **B)** Conformación que adopta el dominio β -Grasp (en **negro**) en el modelo de una GS. Modificada a partir de (Burroughs et al., 2007) y (Krajewski et al., 2008).

Teniendo en cuenta la importancia que este dominio puede tener en la actividad catalítica, se verificó si esta región está o no predicha por el predictor HMMR (Tabla 28). Por otro lado, se analizó la conservación estructural correspondiente al dominio β -Grasp de la GS de *Salmonella typhimurium* (1FPY), cuyo dominio β -Grasp se encuentra entre los aminoácidos 1-100 según las anotaciones de su estructura de cristal, con las secuencias de las proteínas PauA7 y FluG (Tabla 28).

Tabla 28. Predicción de los dominios catalíticos y la conservación estructural del dominio β -Grasp en la GS de *S. typhimurium*, la γ -glutamil ligasa de *P. aeruginosa* y la región C-terminal de FluG. **A)** Las predicciones de los dominios catalíticos están representadas por el mapa de dominios y la cobertura proteica de estos dominios en la GS (GlnA), la γ -glutamil ligasa (PA5508) y FluG. **B)** La conservación del dominio β -Grasp se representa con la cobertura de esta región y la conservación estructural con el valor QMEAN en las secuencias proteicas de PauA7 (PA5508) y FluG, utilizando la GS (1FPY) y la γ -glutamil ligasa (4HPP) como molde.

A	Predicciones de los dominios catalíticos		
	GlnA (STM4007)	PauA7 (PA5508)	FluG C-terminal
Mapa de dominios			
Cobertura de dominios	Gln-synt_N (14-95) Gln-synt_C (102-466)	Gln-synt_N (1-104) Gln-synt_C (105-437)	Gln-synt_C (537-865)
B	Conservación del dominio β -Grasp		
	PauA7 VS 1FPY	FluG VS 1FPY	FluG VS 4HPP
	Cobertura	P6 - W104	T431-L536
Prom. QMEAN	0,64	0,66	0,64

Una vez verificada la presencia del dominio β -Grasp mediante los predictores, los resultados de la Tabla 28 indicaron que la región C-terminal no conserva esta estructura. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 28, el promedio de los valores QMEAN obtenidos muestra que la región C-terminal guarda una similitud estructural que oscila entre 0,64 y 0,66, con el dominio β -Grasp tanto en las estructuras de cristal de la GS (1FPY) como la del cristal 4HPP. Este último resultado sugiere que, a pesar de no predecirse un dominio β -Grasp, la región C-terminal tiene una alta conservación estructural con los cristales 1FPY y 4HPP. Por otro lado, teniendo en cuenta que los valores QMEAN de la Tabla 28 son muy parecidos en los tres casos, sugieren que el dominio β -Grasp no es un factor crítico a la hora de diferenciar una GS y una γ -glutamil ligasa.

Teniendo en cuenta que el dominio β -Grasp mostró no ser determinante entre la GS, la γ -glutamil ligasa y la región C-terminal de FluG, se procedió a analizar la conservación de los residuos predichos tanto para regular la función de la proteína como para interactuar con el sustrato, según Ladner et al. (2012).

2.7.3. FluG conserva una tirosina implicada en la regulación post-traduccional de las GSI

Otra característica a tener en cuenta, es el mecanismo de regulación post-traduccional que utilizan las GS de tipo I para inducir o inhibir su actividad, mediante modificaciones en la estructura o la ocupación del sitio catalítico por distintas sustancias que funcionan como reguladores (Stadtman y Ginsburg, 1974; Gill et al., 2002). Uno de los más estudiados ha sido la regulación por adenilación de una tirosina (Yamashita et al., 1989) (Figura 37).

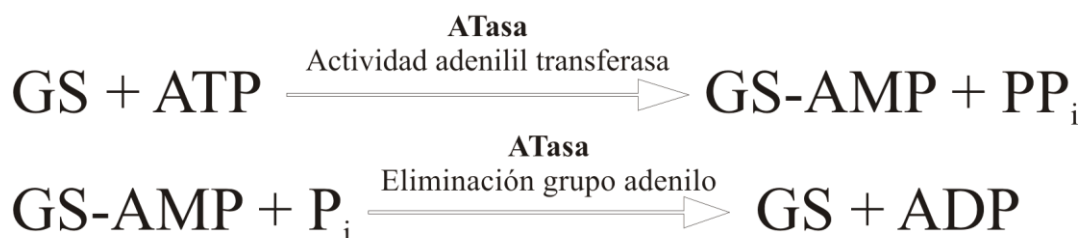


Figura 37. Representación del proceso de adenilación llevada a cabo por una Adenilil transferasa (ATasa) en las GS. En esta reacción, la ATasa tiene la capacidad de, utilizando el ATP, unir covalentemente el grupo AMP a una tirosina presente en algunas GS. Esta misma unión, puede ser también interrumpida por la misma enzima, utilizando un fosfato (P_i) para formar ADP.

Esta modificación cambia las propiedades funcionales del enzima (Stadtman y Ginsburg, 1974; Kimura et al., 1988), entre ellas, la GS sin adenilar tiene preferencia por la utilización del magnesio y un pH óptimo de 7,5, mientras que la GS adenilada, considerada como la forma inactiva de la GS, tiene preferencia por el manganeso como metal y el pH óptimo desciende a 6,5 (Gill et al., 2002).

Ladner et al. (2012) detallan que la estructura 4HPP no contenía una región desordenada entre los aminoácidos 365-381, homóloga a la región que contenía la tirosina (Y397) candidata a ser adenilada en el cristal 1FPY. De la misma forma, la región desordenada del cristal 4HPP tampoco contenía ninguna tirosina, por lo que concluyeron que la proteína PauA7 no está regulada por adenilación. Con el objetivo de verificar si la región C-terminal conserva una tirosina candidata a ser adenilada, se procedió a verificar el modelo de FluG generado por la herramienta Swiss-Model utilizando la estructura 1FPY como base (Tabla 29).

Tabla 29. Alineación que muestra la conservación de la tirosina candidata a ser adenilada en la región desordenada de las proteínas GS (GlnA), la γ -glutamyl ligasa (PauA7) y FluG. Las tirosinas están marcadas en **rojo**.

Conservación de la tirosina (Y) en la región desordenada

GlnA	E390	P391	M392	D393	K394	N395	L396	Y397	D398	L399	P400	P401	E402	E403	A404	K405
PauA7	A365	L366	A367	D368	V369	D370	P371	H372	G373	L374	S375	D376	E377	E378	R379	Q380
FluG	K786	D787	C788	P789	Y790	D791	A792	A793	S794	L795	P796	E797	S798	E799	R800	A801

Una vez analizada la conservación de los residuos en la región desordenada, se pudo confirmar que existe una tirosina en una posición distinta a del modelo 1FPY (Y790). Este resultado abre la posibilidad a que la actividad de la región C-terminal pueda estar regulada por adenilación. Sin embargo, teniendo en cuenta que los valores QMEAN obtenidos en PauA7 y en FluG eran muy bajos utilizando el modelo 1FPY como base, haría falta comprobar si la adenilación de FluG se observa experimentalmente.

2.7.4. Los residuos predichos a interactuar con el sustrato en PauA7, no están conservados en FluG

En el citado estudio (Ladner et al., 2012), se menciona una interacción en esta región nunca antes vista en las GS, en la cual, la Y439 interactuaba con el residuo Q51 de la región que contenía el residuo V42 (residuo homólogo del aspartato que extrae el

protón del amonio en las GS), hecho que podría contribuir al reposicionamiento de los residuos L53 y I54 en el sitio activo. Estos residuos, junto con los residuos V42 y F148 forman una cavidad hidrofóbica que podría interactuar favorablemente con residuos apolares como las aminas heterocíclicas. Con el objetivo de verificar si los residuos candidatos a interactuar con el sustrato están o no conservados en FluG, se llevó a cabo un análisis con los modelos generados por la herramienta Swiss-Model para confirmar su presencia (Tabla 30).

Tabla 30. Conservación de los residuos predichos a interactuar con el sustrato en 4HPP y FluG. La numeración en FluG está indicada utilizando el número de aminoácidos original de la secuencia de FluG (865 aas) y la secuencia correspondiente a la región C-terminal (427-865 aas, en la que el residuo R427 se toma como el primer residuo (R1)). F'148 es un residuo que interactúa con el sustrato desde la cadena adyacente. El parecido de las propiedades de las cadenas laterales de cada residuo, está representada en colores: **Rojo** para los residuos que son distintos y **amarillo** para los residuos que comparten ciertas propiedades.

Conservación de los candidatos a interactuar con el sustrato						
4HPP	V42	Q51	L53	I54	F'148	Y439
FluG	S481	D490	E492	V493	W'592	L861
C-terminal R427→R1	S55	D64	E66	V67	W'166	L435
Naturaleza						

Los resultados reflejados en la Tabla 30 muestran que ninguno de los residuos candidatos a interactuar con el sustrato en la estructura del cristal 4HPP está conservado en la región C-terminal de FluG. Si bien los residuos de 4HPP correspondientes a la V42 (Hidrofóbico), Q51 (Polar y sin carga) y L53 (Hidrofóbico), están sustituidos por aminoácidos de distinta naturaleza como S481 (Polar y sin carga), D490 (Polar y negativamente cargado) y E492 (Polar y negativamente cargado), respectivamente, los residuos I54 (Hidrofóbico) y F148 (Hidrofóbico y voluminoso) de la estructura 4HPP están sustituidos por V493 (Hidrofóbico) y W592 (Hidrofóbico y voluminoso), los cuales comparten la misma naturaleza hidrofóbica y de grandes dimensiones (en el caso del F148 y W592). Sin embargo, en lo que al último residuo se refiere, no se puede esperar que ocurra la interacción entre el residuo Y439 con el residuo Q51 que mencionaba Ladner et al. (2012), ya que el residuo Y439 está sustituido por L861, el cual carece del grupo hidroxilo de la tirosina que reaccionaba con el Q51.

3. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo, han permitido verificar la funcionalidad predicha de la región C-terminal de FluG, como una γ -glutamyl ligasa, mientras que la región N-terminal parece efectivamente cumplir una función amidohidrolasa, que no se ha conseguido especificar. En resumen, nos encontramos frente a una enzima cuyas regiones enzimáticas cobran especial importancia dependiendo del medio en las que se encuentra el hongo. En este aspecto, varios estudios han reportado la existencia de enzimas conocidas como “moonlighting enzymes”, las cuales, son capaces de realizar múltiples funciones autónomas y a menudo no relacionadas, sin dividir estas funciones en diferentes dominios de la proteína (Moore, 2004; Huberts y van der Klei, 2010). En contraste con los resultados obtenidos por D'Souza et al. (2001), en la que se acotó la región funcional de FluG entre los aminoácidos 385-865 de FluG, los resultados bioinformáticos obtenidos en el Capítulo IV han verificado que se trata de una proteína con dos regiones N- (aas 1-406) y C-terminal (aas 427-865) diferenciadas en dos polipéptidos. Los resultados de este capítulo confirman que la región C-terminal de FluG es necesaria para llevar a cabo el desarrollo asexual, mientras que la región N-terminal cumple una función de apoyo muy significativa en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes.

En términos funcionales, se ha descrito que la aparición de enzimas multifuncionales, proporciona una ventaja evolutiva en la eficacia de las rutas metabólicas (Yon-Kahn y Hervé, 2010; Cheng et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que la unión de proteínas que codifican más de una enzima, está estrechamente relacionada con la canalización de dos reacciones sucesivas, cuyo intermediario, se transfiere de una región enzimática a otra en la misma proteína (Perham, 2000; Huang et al., 2001). En este caso, se podría argumentar que la reacción principal la realiza la γ -glutamyl ligasa, pero en ciertas condiciones con la abundancia de otro precursor la actividad amidohidrolasa procuraría una fuente adicional de sustrato. Así mismo, teniendo en cuenta que ambas regiones homólogas a enzimas bacterianas, cabe la posibilidad de que su presencia puede estar relacionada con eventos de fusión y fisión impulsados por la evolución paráloga de bacterias a hongos (Mathis et al., 2000). En apoyo a esta hipótesis, el hecho de que las secuencias homólogas a FluG presentes en bacterias (Strong et al., 2003; Rexer et al., 2006), se encontrasen como polipéptidos separados dentro de operones, sugiere que, en hongos y plantas, la presión evolutiva haya

podido inducir la fusión entre ambos polipéptidos (Long, 2000; Durrens et al., 2008). En este capítulo, la expresión de ambas regiones de FluG como dos péptidos separados en el mismo mutante, ha desvelado que, en un medio completo, ambas regiones desempeñan mejor su función en el desarrollo asexual cuando están unidas.

De la misma forma, los resultados obtenidos en medio mínimo tras analizar el desarrollo sexual en los mutantes que contenían las regiones N-terminal y C-terminal individualmente, han demostrado que, si bien, la región C-terminal es imprescindible para llevar a cabo esta función, la presencia de ambas regiones es necesaria para una producción de cleistotecios semejante a la obtenida en una cepa silvestre. En medio completo, no obstante, una cepa que expresa la región N-terminal no produce ningún cleistotecio, mientras que un mutante que contiene la región C-terminal, produce una cantidad semejante a la observada en una cepa silvestre. Estos últimos resultados, sugieren que, el medio completo pueda tener una sustancia que sea necesaria para que el mutante C-terminal pueda llevar a cabo el desarrollo sexual como una cepa silvestre. Estos resultados contrastan con los reportados por Chang et al. (2012), en el que confirmaron que en *Aspergillus flavus*, FluG cumple una función importante en el desarrollo sexual, no siendo así en el desarrollo asexual.

Si bien, los antecedentes en la caracterización de FluG en otros *Aspergilli* (Mah y Yu, 2006; Ogawa et al., 2010; Chang et al., 2012; Wang et al., 2015), han asignado distintos papeles a FluG, no existen registros en los que se haya verificado una función enzimática. Teniendo en cuenta que los resultados del Capítulo IV en el que se desveló que los homólogos de FluG presentes en bacterias, hongos y plantas, conservaban los residuos catalíticos que se han localizado para las regiones N- y C-terminal, se decidió llevar a cabo una estrategia de mutaciones puntuales de todos los residuos para determinar si mostraban algún defecto fenotípico. Las mutaciones puntuales han validado la predicción *in silico* llevada a cabo en el capítulo anterior, en el cual se le había adscrito una función a cada residuo mutado en las regiones N- y C-terminal de FluG. Los resultados fenotípicos observados en los mutantes puntuales de la región N-terminal aportan evidencia contundente a favor de que esta región cumple una función amidohidrolasa, ya que los tres residuos mutados están presentes en varias enzimas con una función amidohidrolasa (Hernick y Fierke, 2013). Por otro lado, los resultados obtenidos de los mutantes puntuales de la región C-terminal, han confirmado los residuos

funcionalmente importantes en las GS y las γ -glutamil ligasas, cumplen una función importante en FluG (Ladner et al., 2012).

Los análisis de expresión de los mutantes, han desvelado que, si bien la expresión de todos los mutantes es al menos tan abundante a la observada en una cepa silvestre, la mayoría de los mutantes, han exhibido una expresión considerablemente superior. Este hecho también ha sido previamente reportado por Lee y Adams (1994) y Yager et al. (1998), quienes reportaron una expresión aberrante de FluG por mutaciones que afectaban a su función. Este hecho sugiere que FluG pueda estar autoregulado mediante algún factor de transcripción que pueda responder (Thieme et al., 2018), a los niveles de sustrato o producto de la enzima.

En lo que respecta a la posible función enzimática de FluG se refiere, un estudio llevado a cabo por Margelis et al. (2001), sustituyó heterológamente el gen *fluG* de *A. nidulans* por la GS (*glnA*) del organismo procariota *Anabaena sp.*, confirmando que este último no revertía los defectos causados por la ausencia de FluG. Si bien, esta aproximación sirvió para descartar que FluG tuviera la actividad enzimática de una GS, teniendo en cuenta que en el Capítulo IV las estructuras homólogas a la región N- y C-terminal de FluG que se encontraron, eran originarias de *Lactobacillus paracasei* y *Pseudomonas aeruginosa*, se procedió a sustituir heterológamente las dos regiones de FluG por sus homólogos bacterianos, para comprobar si son capaces de llevar a cabo *in vivo* la función nativa de FluG. Los resultados han demostrado que ambas proteínas codificadas por los genes LSEI_0440 y PA5508 cumplen el papel de la región N- y C-terminal de FluG, respectivamente. Cabe destacar que el hecho de haber observado un fenotipo semejante al de la cepa silvestre en la quimera con ambos genes bacterianos fusionados, sugiere que la función enzimática que cumplen estas enzimas, sea similar o idéntica a la que lleva a cabo FluG.

Por otro lado, se pudo observar que el gen NodGS, homólogo a FluG en *A. thaliana*, no complementó la función nativa en *A. nidulans*. Si bien, se pudo confirmar que NodGS conserva todos los residuos catalíticos predichos, es posible que los codones que codifican los aminoácidos no sean los óptimos para llevar a cabo la traducción a la velocidad óptima, junto con su posterior plegamiento de la proteína (Plotkin y Kudla, 2011). No obstante, teniendo en cuenta los informes que se han reportado en torno a la función de NodGS (Doskočilová et al., 2011) y su homólogo en *Medicago truncatula*

(Trujillo, 2019), es muy probable que la función que desempeñan estos homólogos sea distinta o se haya especializado lo suficiente como para no complementar el papel de FluG en *A. nidulans*.

Finalmente, en análisis bioinformático llevado a cabo en profundidad comparando la región C-terminal con la estructura de cristal de la γ -glutamil ligasa PauA7, indica que ambas comparten dominios similares, como una correa helicoidal orientada hacia el interior de la proteína y la ausencia de dos láminas beta. No obstante, se han detectado también diferencias tanto en la conservación de una tyrosina candidata a ser adenilada, como la falta de conservación de los residuos candidatos a interactuar con el sustrato, lo cual implica que se necesitaría llevar a cabo un trabajo experimental más exhaustivo para valorar la importancia de estos residuos.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL

FluG está acreditado como uno de los primeros factores de acción temprana en la inducción de la conidiación (Park y Yu, 2012). Sin embargo, su caracterización ha seguido una sinuosa trayectoria, que ha mantenido la incógnita en cuanto a su papel en el desarrollo asexual. El trabajo pionero de Adams y colaboradores (Lee y Adams, 1994; Wieser et al., 1994), apuntó el carácter enzimático de este factor, como una hipotética glutamina sintetasa de tipo I, mientras que estudios posteriores no permitieron elucidar la función precisa (Margelis et al., 2001). Posteriormente, otros trabajos relacionaron al factor con la luz (Yager et al., 1998; Ruger-Herreros et al., 2011) y el complejo Velvet (Chang et al., 2013), desviando el enfoque inicial, quedando así la función en un estado de indefinición. Tras el trabajo presentado en esta tesis, la función enzimática inicialmente hipotetizada por Lee y Adams (1994) queda precisada y parcialmente confirmada, si bien permanecen aún sin demostrar las reacciones precisas que desempeña. En cualquier caso, la información aportada en este estudio da cabida para hipotetizar sobre la posible naturaleza de estas reacciones y el papel que pueden jugar en el contexto general del desarrollo asexual y del funcionamiento del micelio como unidad multicelular.

Una enzima bifuncional

Los resultados de este estudio han demostrado que FluG consta de dos regiones con actividades enzimáticas predichas (una amidohidrolasa y una γ -glutamil ligasa) capaces de desempeñar sus funciones por separado al igual que sus ortólogas bacterianas. Las enzimas bifuncionales, así como los complejos multienzimáticos, están justificados por el aumento de eficacia que propicia la proximidad espacial entre las unidades catalíticas, minimizando así las ineficacias relacionadas con la difusión de los intermediarios.

En el caso de FluG, se trata de dos enzimas unidas por una secuencia que carece de estructura. A falta de un conocimiento más específico sobre las reacciones de las dos enzimas, el análisis funcional basado en el número de esporas obtenido permite extraer conclusiones en el ámbito de los procesos biológicos afectados. En medio mínimo, en el que existe una cierta limitación nutritiva, los resultados indicaron que la región C-terminal (en adelante γ -glutamil ligasa) es capaz de llevar a cabo la función biológica relacionada con el desarrollo asexual sin aportación aparente por parte de la región N-terminal (en adelante amidohidrolasa). Estudios anteriores ya indicaron que la región C-terminal era imprescindible para la actividad de FluG (D'Souza et al., 2001). En el medio

completo, en el que el aporte de nitrógeno orgánico es considerable, la actividad amidohidrolasa juega un papel determinante para mantener niveles de conidiación comparables con los de la cepa silvestre. En su ausencia, se observa un desequilibrio morfológico en favor del crecimiento vegetativo (Figura 38).

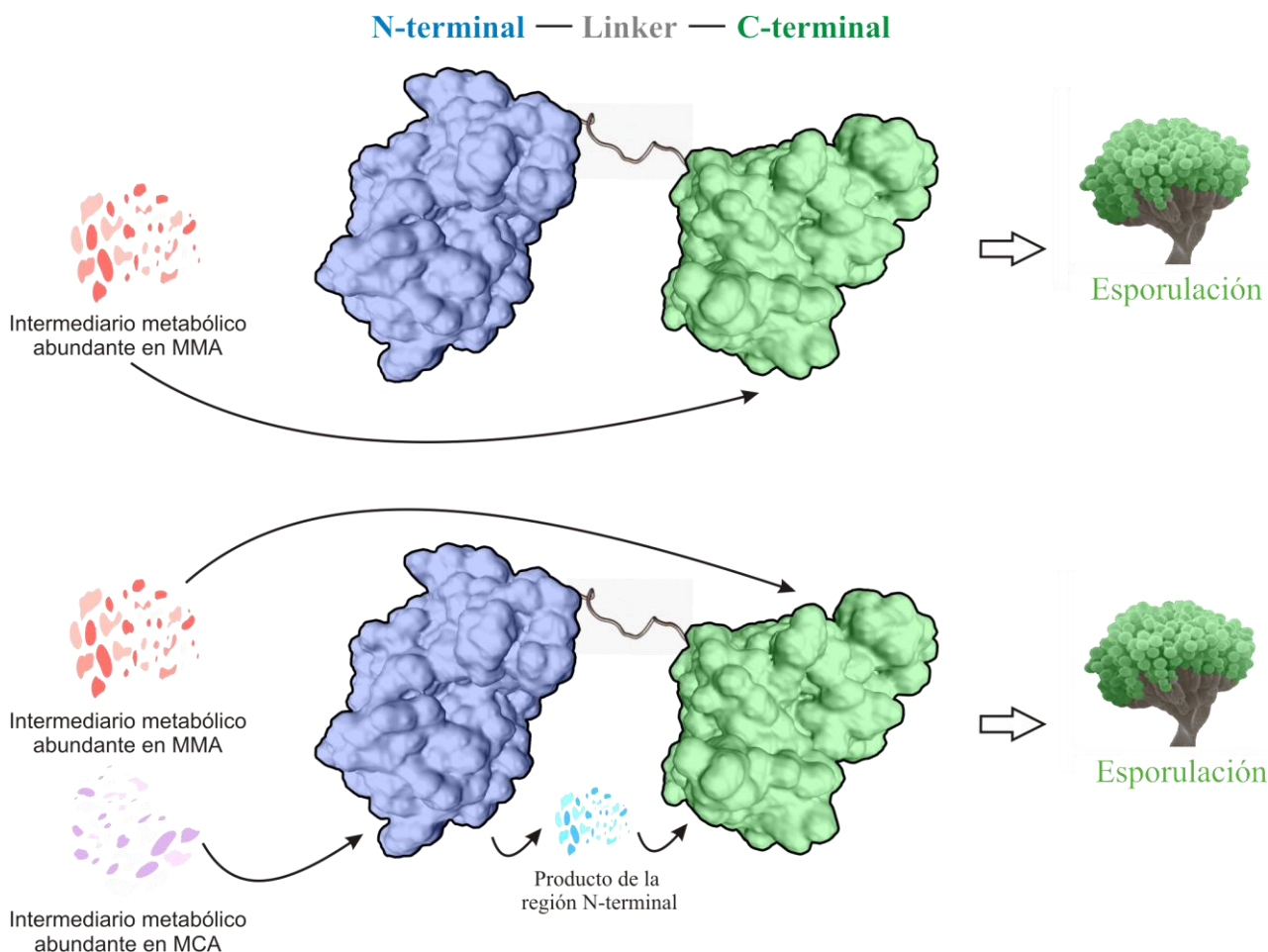


Figura 38. Representación de la hipotética utilización que tienen la región N-terminal (**azul**) y la región C-terminal (**verde**) de FluG, empleando un intermediario metabólico abundante en hifas cultivadas en MMA (**rojo**) y MCA (MMA (**rojo**) + Extracto de levadura (**morado**)). En MMA, la región C-terminal de FluG es suficiente para llevar a cabo la esporulación. En MCA, se considera que la región N-terminal es necesaria para procesar un intermediario metabólico sintetizado en presencia del extracto de levadura. Se especula que el producto de la región N-terminal pueda servir como sustrato de la región C-terminal o que una vez transformado por la región N-terminal, deje de funcionar como señalizador del crecimiento. Las estructuras tridimensionales de ambas regiones se han obtenido a partir de las estructuras de cristal obtenidas de los homólogos bacterianos de *Lactobacillus paracasei* para la región N-terminal (2QPX), y *Pseudomonas aeruginosa* para la región C-terminal (4HPP). La imagen del conidióforo ha sido modificada a partir de (Rodríguez-Romero et al., 2010).

Dado que la actividad fundamental de FluG se centra en la γ -glutamil ligasa, comenzaremos por analizar esta actividad. Las enzimas bacterianas que han sido capaces de sustituir la función nativa en este estudio participan en la degradación de fuentes complejas de nitrógeno, principalmente aminas, para formar compuestos más simples que

puedan ser procesados hacia otros procesos metabólicos como el crecimiento, la síntesis de proteínas o la comunicación con otros organismos (Reitzer, 2003; van Heeswijk et al., 2013; Luengo y Olivera, 2020). Un ejemplo es el proceso de degradación de varias aminas lineales como la putrescina (Kurihara et al., 2008; Krysenko et al., 2017), la cadaverina, etanolamina (Krysenko et al., 2019) y aminas aromáticas (Arora, 2015) como la anilina (Takeo et al., 2013) o síntesis de la metilamina (Yamamoto et al., 2008) mediante la γ -glutamilación. Si bien este proceso fue atribuido a ciertas proteínas homólogas a las inicialmente categorizadas como GS, estudios más detallados demostraron que estas efectúan una γ -glutamilación. La enzima γ -glutamil ligasa PauA7 (Ladner et al., 2012) que sustituye funcionalmente la actividad de FluG *in vivo* guarda cierta similitud de secuencia con una GS, pero su función es la γ -glutamilación de catecolaminas (Figura 39). Esta propiedad también se ha atribuido más recientemente a otras enzimas no homólogas a las GS que cumplen la misma función sobre aminas aromáticas como la tiramina (Wang et al., 2014).

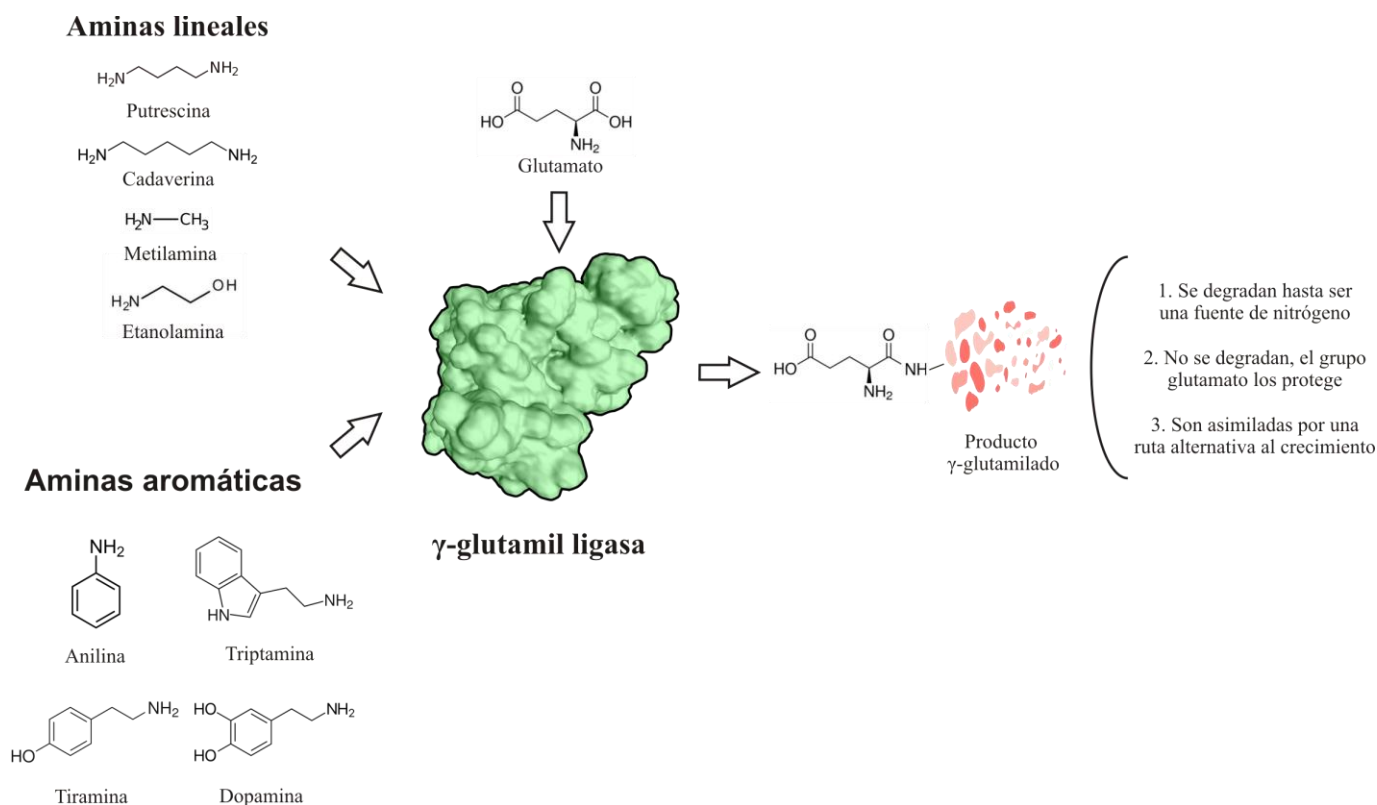


Figura 39. Esquema del tipo de aminas cuya utilización por γ -glutamil ligasas ha sido confirmada. Estas aminas, una vez γ -glutamiladas (**producto γ -glutamilado**), son procesadas por rutas alternativas que pueden derivar en la degradación de estas mismas para emplearlas como fuente de nitrógeno, o, alternativamente, se postula que la glutamilación pudiese resultar dar lugar a la señal que destine el compuesto a otros procesos como la señalización del inicio de procesos como la conidiación o el desarrollo sexual.

A lo largo de la escritura de esta tesis, la publicación de nuevos estudios centrados en la resolución de estructuras de cristal ha permitido encontrar una nueva enzima candidata, denominada γ -glutamil metilamida sintetasa (GmaS) (Wang et al., 2020). Se ha podido verificar que la enzima GmaS, al igual que la enzima PauA7, tiene estrecha similitud con una GS. No obstante, no conserva los dos residuos catalíticos presentes en una GS, los cuales interaccionan con el amonio, y llevan a cabo el último paso para formar el producto. Cabe resaltar también que otro estudio ha reportado la capacidad que tienen las enzimas GmaS de utilizar distintos tipos de aminas alifáticas (lineales) y aromáticas (cíclicas) como sustrato para posteriormente γ -glutamarlas (Pan et al., 2020). Las evidencias recogidas en torno a la actividad tan versátil que presentan las enzimas γ -glutamil ligasas, invita a pensar que FluG pueda también conservar cierta promiscuidad por un abanico de sustratos destinados tanto al crecimiento como a la diferenciación del micelio.

Los resultados obtenidos en esta tesis mediante mutaciones puntuales en los residuos catalíticos predichos y la sustitución de su homólogo bacteriano, apoyan la interpretación de que FluG puede estar cumpliendo una función enzimática semejante a la γ -glutamilación de uno o varios sustratos. El objetivo último, reportado en bacterias, es la degradación de poliaminas. Varios estudios han resaltado la importancia de la putrescina (Sneath, 1955; Guzmán-de-Peña et al., 1998) y la espermidina (Jin et al., 2002) en las etapas del desarrollo asexual, desarrollo del tubo germinativo y el metabolismo secundario de *A. nidulans* y en el desarrollo asexual de otros hongos (Mead et al., 2013). Sin embargo, no se ha reportado un requerimiento directo de poliaminas exógenas para la producción de conidióforos y su presencia en el medio no contribuyen a inducir o aumentar los niveles de conidiación (U. Ugalde, comunicación personal). Por tanto, parece poco probable que el proceso en el que participa esta enzima sea equiparable al observado en bacterias que emplean las poliaminas como fuente de carbono y nitrógeno. Una posibilidad a considerar podría ser que FluG intervenga sobre intermediarios resultantes de procesos de autofagia, como la degradación de purinas y pirimidinas, o el ciclo de la urea, como se verá más tarde.

Una vez formulada una propuesta sobre la actividad γ -glutamil ligasa, pasamos examinar la actividad amidohidrolasa, recordando que esta actividad es especialmente relevante en condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno orgánico (aminoácidos y

ácidos nucleicos). Los análisis de secuencia no han permitido identificar posibles ortólogos. Sin embargo, los residuos conservados corresponden a los de una dihidropirimidinasa bacteriana, la cual participa en la síntesis y degradación de las pirimidinas (Lohkamp et al., 2006). Esta función es llevada a cabo en *A. nidulans* por un enzima filogenéticamente distante (Aleksenko et al., 1999). En este contexto, no se puede especular en detalle sobre los sustratos posibles de la amidohidrolasa. Sin embargo, es probable que estén relacionados con procesos de autofagia, como la degradación de purinas (Gournas et al., 2011) y pirimidinas (Aleksenko et al., 1999). En el caso de las purinas, la degradación de la adenina resulta en la formación moléculas cíclicas como la el ácido úrico o la xantina, las cuales siguen siendo degradados hasta formar productos como la alantoina, urea o el amonio. Cabe resaltar que los residuos catalíticos tanto en la deaminasas de la amina (NadA) (Oestreicher et al., 2008) como la ureasa (UreB) (Kappaun et al., 2018), están conservados en la amidohidrolasa. No obstante, ambas proteínas no comparten similitud estructural. En el caso de las pirimidinas, tanto el uracilo como la timina se podrían degradar dando lugar a la β -alanina o β -aminoisobutirato (Schnackerz y Dobritzsch, 2008).

Los productos de la amidohidrolasa podrían ser γ -glutamilados, evitando que la ruta de degradación culminase en la acumulación de glutamina, un reconocido estimulante del crecimiento vegetativo en *Neurospora crassa* (Cardenas y Hansberg, 1984). En este punto, cabe recordar que el fenotipo resultante de la ausencia de FluG es, precisamente un fenotipo de crecimiento vegetativo desbocado en fase aérea.

El sentido global de esta configuración enzimática será abordado en la siguiente sección.

La función de FluG en el contexto del micelio

Estudios sobre la génesis y desarrollo del micelio, y particularmente en *A. nidulans*, muestran que, tras la germinación, tiene lugar una fase de crecimiento vegetativo, a la que sucede la emergencia de los primeros conidióforos (Cohen, 1973). En ese periodo denominado periodo de competencia (16 horas), se ha establecido que la colonia adquiere la *competencia* para iniciar el desarrollo asexual (Axelrod et al., 1973). Todavía no se ha establecido con claridad qué parámetros son los que definen la consecución de esa competencia (Noble y Andrianopoulos, 2013), pero puede que se trate de una

combinación de factores asociados a la generación de una colonia con una masa y heterogeneidad suficiente que pueda dar soporte a los cambios morfogénéticos implicados en el desarrollo asexual (Figura 40).

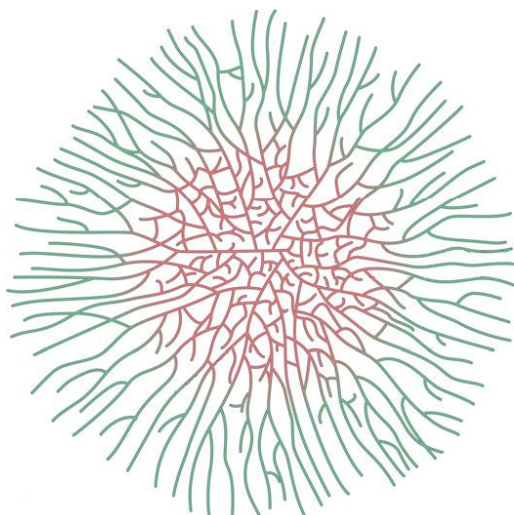


Figura 40. Representación de la disponibilidad de los nutrientes en el medio a lo largo de una colonia, en el que se representa en **verde** una alta concentración de nutrientes y en **rojo** una baja concentración de nutrientes. Modificada a partir de (Jedd y Pieuchot, 2012).

A medida que la colonia se va desarrollando, aumenta su heterogeneidad fisiológica. Se han reportado diferencias en los niveles de ARN presentes entre la zona central y la zona periférica de las colonias de *A. niger* (Levin et al., 2007) y *A. oryzae* (Masai et al., 2006), especialmente en los genes relacionados con la síntesis y modificación de la pared celular, el metabolismo del nitrato y el transporte de macromoléculas. La mitad de la variación del ARN observada puede ser explicada por la diferencia en la composición del medio en cada zona, mientras que la otra mitad está condicionada por otros factores como la localización de la célula en la colonia o los procesos metabólicos que están ocurriendo en cada zona del micelio (Levin et al., 2007).

El citado periodo de competencia de 16 horas antes de la iniciación del desarrollo asexual podría marcar el punto en el que se establece la diferencia entre células del micelio. Teniendo en cuenta una frecuencia de duplicación de 60 minutos (Harris, 1997), el primer conidióforo se encontraría a unas 16 células de las hifas más periféricas de la colonia. El entorno en el que se encuentran los conidióforos ocupa zonas del micelio en las que el acceso a los nutrientes es limitado. Además, cabe resaltar que el conidióforo es una estructura de grandes dimensiones, capaz de albergar alrededor de 1×10^4 conidias (Adams et al., 1998). Esto implica que una cantidad importante de recursos necesarios

para generar un conidióforo se obtengan por medio de la autofagia y transporte desde células distales circundantes. Estudios en los que se han caracterizado mutaciones en genes que regulan la autofagia (Atg8 y Atg1, en *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus fumigatus*, respectivamente) muestran defectos en los que se observa una disminución en la formación de hifas aéreas (Kikuma y Kitamoto, 2011) y la formación de conidias (Richie et al., 2007).

Sin una garantía de que el proceso estuviese material y energéticamente cubierto, la observación habitual de conidióforos atrofiados o escasamente provistos de conidias sería habitual. Sin embargo, no se conocen descripciones en este sentido en la bibliografía. Una estimación aproximada de ese número se puede obtener calculando el cociente entre el número de núcleos en el micelio ($1,69 \times 10^4 / \text{mm}^2$) y el número de conidióforos ($265,4 / \text{mm}^2$) ((Gifford y Schoustra, 2013) y referencias incluidas). El *quorum* podría situarse entre 63 y 64 núcleos (Figura 41).

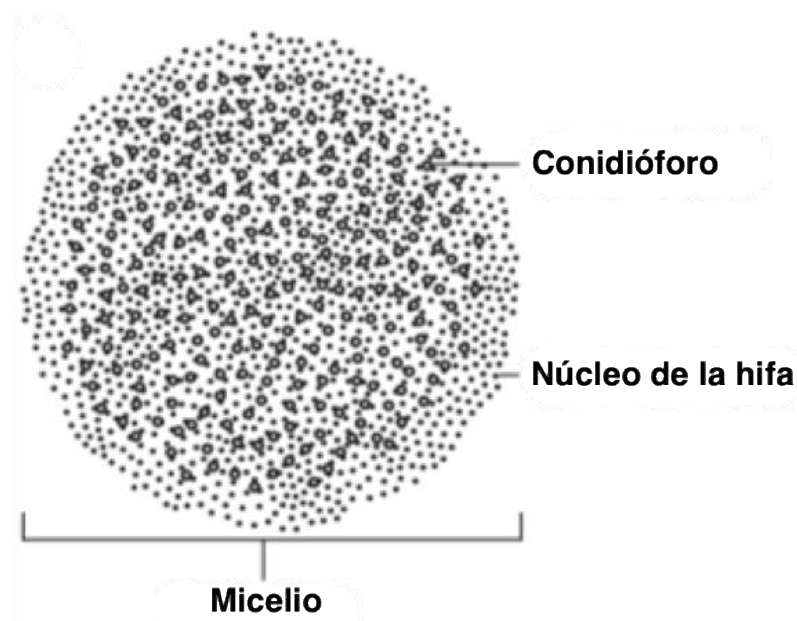


Figura 41. Anagrama zonal donde se representa la distribución de los núcleos de las hifas (.) y los conidióforos (o). Imagen editada a partir de (Gifford y Schoustra, 2013)

Aceptando que el desarrollo asexual está vinculado con la autofagia, cabe contemplar que el inicio del proceso requiera de un *quorum* mínimo de células distales que aporten suficientes recursos para completar el proceso (Figura 42).

En vista de que la característica común de aquellas células que constituyesen el *quorum* para la gestación de un conidióforo sería la inducción de la autofagia, podría postularse que cualquier señal que diese cuenta de ese *quorum* debería derivar de ese mismo proceso. El ciclo de la urea juega un papel muy importante en el reciclado de nitrógeno durante la autofagia (Beckmann et al., 2013) y existen algunos datos circunstanciales que apuntan a que este ciclo podría tener alguna conexión con la actividad de FluG. Mutantes afectados en el gen *argB* carecen de actividad ornitina carbamil transferasa, una enzima mitocondrial responsable de la producción de citrulina en el ciclo de la urea. El fenotipo de estos mutantes se manifiesta como una auxotrofia para la arginina. Los mutantes *argB*⁻ son viables en medio completo, en el que hay un aporte de aminoácidos, incluida la arginina. Sin embargo, manifiestan niveles de conidiación deficientes (Serlupi-Crescenzi et al., 1983). Cuando estos mutantes se han empleado en experimentos de contacto con mutantes nulos de *fluG*, han resultado ser deficientes como donantes (U. Ugalde, comunicación personal). Estas observaciones permiten hipotetizar una posible conexión entre paso metabólico cubierto por *fluG* y el ciclo de la urea.

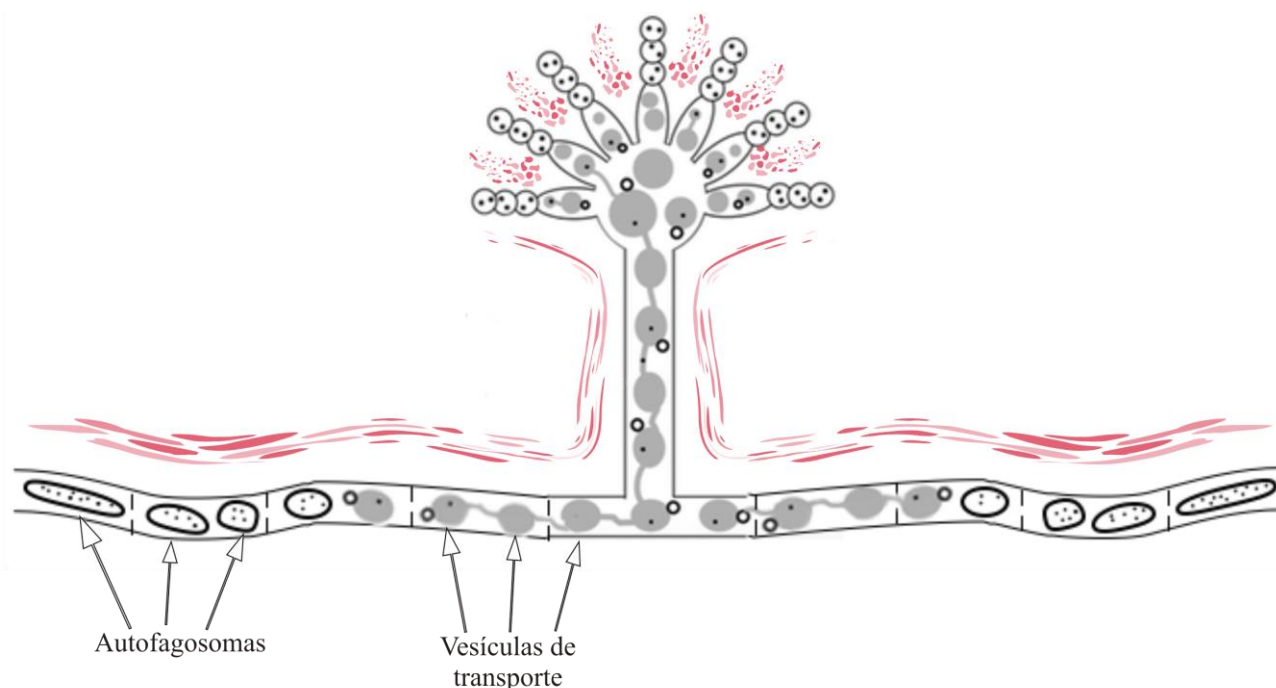


Figura 42. Diagrama esquemático en el que se representa en **rojo** el flujo de nutrientes reciclados por autofagia en la zona interior de la colonia. Los nutrientes reciclados por la autofagia se transportan a través de vacuolas esféricas y tubulares y se almacenan en conidias. Las vacuolas esféricas y tubulares son de color **gris**, y los nutrientes están indicados mediante puntos negros. El flujo de nutrientes está indicado de forma que es transportado a lo largo de las hifas, y llega hasta las conidias de la parte superior de los conidióforos. Las vacuolas en las que ocurre la autofagia se indican con un círculo en **negrita**. Modificado a partir de (Kikuma et al., 2007).

Además de las anteriores consideraciones, cabe contemplar si el producto de FluG actúa como un metabolito que sea transportado al conidióforo para jugar un papel metabólico específico, o bien actúe como una señal. En este sentido, el estudio desarrollado por Rodríguez-Urra et al. (2012) indica que el factor que causa la conidiación exógenamente se encuentra principalmente en el medio y no se acumula en el micelio (Rodríguez-Urra et al., 2012). Este importante dato apoya la hipótesis de que se trata de una señal, probablemente indicativa del número de células distales de un micelio que han iniciado la autofagia. En términos mecánicos el modo de acción sería similar al de otras señales denominadas *quorum sensing* en bacterias (Abisado et al., 2018) y en hongos (Mehmood et al., 2019).

El papel de FluG más allá de su relación como UDA

Los resultados presentados en esta tesis, han confirmado que FluG tiene al menos un papel enzimático en la inducción de la esporulación. Teniendo en cuenta que la mayoría de factores que conforman el grupo de los UDAs está formado por factores de transcripción (*flbB*, *flbC* y *flbD*), la naturaleza enzimática de FluG invita a revisar la agrupación de factores en el desarrollo asexual. Cabe destacar que, al igual que FluG, se han caracterizado un abanico de enzimas necesarias para llevar a cabo el desarrollo asexual, entre los que destacan ArgB (Ornitina carbamil transferasa) (Serlupi-Crescenzi et al., 1983), PuA (Ornitina decarboxilasa) (Sneath, 1955; Guzmán-de-Peña et al., 1998), NpgA (Fosfopantetenil transferasa) (Márquez-Fernández et al., 2007), TmpA (Oxidoreductasa de membrana) (Soid-Raggi et al., 2006), TmpB y AfeA (Adenilil ciclasas) (Soid-Raggi et al., 2016), GmcA (Oxidoreductasa de glucosa, metanol y colina) (Etxebeste et al., 2012),... entre otras. Estos factores seguramente forman parte de la maquinaria bioquímica necesaria para iniciar el desarrollo (Clutterbuck, 1969; Martinelli y Clutterbuck, 1971). En este aspecto, se puede considerar que estos factores no regulan, sino llevan a cabo procesos metabólicos específicos del desarrollo asexual. En el caso de FluG, los datos aportados en esta tesis apuntan a que el efecto de la señal también podría dar cuenta del número y tamaño de los cleistotecios que forman las colonias.

De la misma forma, aunque los resultados obtenidos en esta tesis han expuesto que tanto en bacterias, en hongos y en plantas, los homólogos de FluG conservan todos los residuos catalíticos, es probable que el papel de FluG se haya especializado para cada organismo. Desde un punto de vista evolutivo, se puede postular la hipótesis de que FluG,

puede que fuera un sistema que algunos organismos de los tres reinos han utilizado durante mucho tiempo para comunicarse, estableciendo una relación basada en el intercambio de sustancias (metabolitos) y alimento (micronutrientes), el cual podría translocarse desde las bacterias (dando nitrógeno), a través del hongo (funcionando como mediador o `peaje`), hasta llegar a la planta. Este proceso se podría repetir también en la dirección opuesta, desde la planta (dando carbono), a través del hongo (funcionando como mediador o `peaje`), hasta llegar a las bacterias. De la misma forma, el hongo podría haber heredado este sistema para comunicarse con las células dentro del micelio, es decir, entre las células vegetativas y el conidióforo.

Teniendo en cuenta la naturaleza enzimática de FluG, algunos estudios han postulado sobre un hipotético papel que FluG puede tener en torno al metabolismo del nitrógeno que ocurre en plantas leguminosas (Mathis et al., 1999; Trevaskis et al., 2002; Trujillo, 2019). No obstante, haría falta un estudio metabólico para poder verificar si alguno de los procesos metabólicos mencionados en plantas leguminosas sufre algún cambio en *A. nidulans*. Por otro lado, teniendo en cuenta que se ha postulado sobre la relación que puede tener FluG en el *quorum sensing*, sería interesante llevar a cabo un análisis a nivel de la colonia, como se ha llevado a cabo en otros estudios (Levin et al., 2007), para comprobar si se observan cambios en el papel enzimático de FluG a lo largo de la colonia. Finalmente, cabe la posibilidad de que la actividad de las regiones de FluG pueda estar ligada al flujo y asimilación de nutrientes o metabolitos secundarios, cuyo papel en el metabolismo del hongo no haya sido desvelado a día de hoy (Medema y Fischbach, 2015).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La función biológica de FluG afecta tanto al desarrollo asexual como sexual y no está directamente relacionada con la producción o inducción de la conidiación causada por el meroterpenoide deshidroaustinol.
2. FluG está formada por dos enzimas unidas por un fragmento sin estructura que pueden actuar por separado, pero cuya función biológica es óptima cuando están unidas.
3. La función del extremo C-terminal de FluG es necesaria y suficiente para inducir el desarrollo asexual en condiciones de cultivo exentas de estrés (osmótico o por hambe de nutrientes). La función de la región N-terminal es relevante en condiciones de alto aporte de nitrógeno.
4. La región C-terminal de FluG presenta homología con una γ -glutamyl ligasa bacteriana, mientras que la región N-terminal presenta homología con una amidohidrolasa bacteriana sin especificar.
5. Ambas regiones pueden ser sustituidas individual y conjuntamente por secuencias homólogas de bacterias sin alteraciones notables en la función biológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A. y Chandler, J.R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio* 9(3). doi: 10.1128/mBio.02331-17.
- Adams, T.H., Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54(3), 353-362. doi: 0092-8674(88)90198-5 [pii].
- Adams, T.H., Wieser, J.K. y Yu, J.H. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1), 35-54. <http://mmbbr.asm.org/content/62/1/35.long>.
- Ahuja, M., Chiang, Y.M., Chang, S.L., Praseuth, M.B., Entwistle, R., Sanchez, J.F., et al. (2012). Illuminating the Diversity of Aromatic Polyketide Synthases in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* 134(19), 8212-8221. doi: 10.1021/ja3016395.
- Aleksenko, A., Liu, W., Gojkovic, Z., Nielsen, J. y Piskur, J. (1999). Structural and transcriptional analysis of the pyrABCN, pyrD and pyrF genes in *Aspergillus nidulans* and the evolutionary origin of fungal dihydroorotases. *Mol Microbiol* 33(3), 599-611. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01507.x.
- Andersen, M.R. (2014). Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: orphaned research in characterizing orphan genes. *Brief Funct Genomics* 13(6), 451-455. doi: 10.1093/bfgp/elu029.
- Anderson, J.G. y Smith, J.E. (1971). The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). *J Gen Microbiol* 69(2), 185-197. doi: 10.1099/00221287-69-2-185.
- Arora, P.K. (2015). Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. *Front Microbiol* 6, 820. doi: 10.3389/fmicb.2015.00820.
- Atoui, A., Kastner, C., Larey, C.M., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E.A., et al. (2010). Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47(12), 962-972. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.007.
- Axelrod, D.E., Gealt, M. y Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* 34(1), 9-15. doi: 10.1016/0012-1606(73)90335-7.
- Basenko, E.Y., Pulman, J.A., Shanmugasundram, A., Harb, O.S., Crouch, K., Starns, D., et al. (2018). FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *J Fungi (Basel)* 4(1). doi: 10.3390/jof4010039.
- Bayram, O., Braus, G.H., Fischer, R. y Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal. Genet. Biol* 47(11), 900-908. doi: S1087-1845(10)00100-3 [pii];10.1016/j.fgb.2010.05.008 [doi].
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320(5882), 1504-1506. doi: 10.1126/science.1155888 [doi].

- Beckmann, N., Schafferer, L., Schrettl, M., Binder, U., Talasz, H., Lindner, H., et al. (2013). Characterization of the Link between Ornithine, Arginine, Polyamine and Siderophore Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 8(6), e67426. doi: 10.1371/journal.pone.0067426.
- Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., et al. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 58(Pt 6 No 1), 899-907. doi: 10.1107/S0907444902003451.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62(3), 293-300. <https://jlb.asm.org/content/jlb/62/3/293.full.pdf>.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42(Web Server issue), W252-W258. doi: 10.1093/nar/gku340.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., et al. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol* 15(20), 1833-1838. doi: S0960-9822(05)01020-1 [pii];10.1016/j.cub.2005.08.061 [doi].
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., et al. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res* 41(Web Server issue), W29-33. doi: 10.1093/nar/gkt282.
- Brown, J.R., Masuchi, Y., Robb, F.T. y Doolittle, W.F. (1994). Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *J Mol Evol* 38(6), 566-576. doi: 10.1007/BF00175876.
- Buller, A. (1933). *Researches on Fungi*. Longman, London.
- Burroughs, A.M., Balaji, S., Iyer, L.M. y Aravind, L. (2007). Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold. *Biol Direct* 2, 18. doi: 10.1186/1745-6150-2-18.
- Butnick, N.Z., Yager, L.N., Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1984). Genetic Analysis of Mutants of *Aspergillus nidulans* Blocked at an Early Stage of Sporulation. *J Bacteriol* 160(2), 541-545. <https://jlb.asm.org/content/jlb/160/2/541.full.pdf>.
- Calvo, A.M. (2008). The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal. Genet. Biol* 45(7), 1053-1061. doi: S1087-1845(08)00050-9 [pii];10.1016/j.fgb.2008.03.014 [doi].
- Capra, J.A. y Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics* 23(15), 1875-1882. doi: 10.1093/bioinformatics/btm270.
- Cardenas, M.E. y Hansberg, W. (1984). Glutamine metabolism during aerial mycelium growth of *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 130(7), 1733-1741. doi: 10.1099/00221287-130-7-1733.
- Casselton, L. y Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet* 3(9), 683-697. doi: 10.1038/nrg889 [doi];nrg889 [pii].
- Cerqueira, G.C., Arnaud, M.B., Inglis, D.O., Skrzypek, M.S., Binkley, G., Simison, M., et al. (2014). The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and

- incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* 42, D705-710. doi: 10.1093/nar/gkt1029.
- Chang, P.K., Scharfenstein, L.L., Li, P. y Ehrlich, K.C. (2013). *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genetics and Biology* 58-59, 71-79. doi: 10.1016/j.fgb.2013.08.009.
- Chang, P.K., Scharfenstein, L.L., Mack, B. y Ehrlich, K.C. (2012). Deletion of the *Aspergillus flavus* Orthologue of *A. nidulans fluG* Reduces Conidiation and Promotes Production of Sclerotia but Does Not Abolish Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 78(21), 7557-7563. doi: 10.1128/AEM.01241-12.
- Chen, M., Yang, H.Y., Cao, Y.R., Hui, Q.Q., Fan, H.F., Zhang, C.C., et al. (2020). Functional Characterization of Core Regulatory Genes Involved in Sporulation of the Nematophagous Fungus *Purpureocillium lavendulum*. *mSphere* 5(5). doi: 10.1128/mSphere.00932-20.
- Cheng, X.Y., Huang, W.J., Hu, S.C., Zhang, H.L., Wang, H., Zhang, J.X., et al. (2012). A global characterization and identification of multifunctional enzymes. *PLoS One* 7(6), e38979. doi: 10.1371/journal.pone.0038979.
- Cheon, Y.H., Kim, H.S., Han, K.H., Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D., et al. (2002). Crystal structure of D-Hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into the stereochemistry of enantioselectivity. *Biochemistry* 41(30), 9410-9417. doi: 10.1021/bi0201567.
- Chou, H.T., Kwon, D.H., Hegazy, M. y Lu, C.D. (2008). Transcriptome Analysis of Agmatine and Putrescine Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 190(6), 1966-1975. doi: 10.1128/JB.01804-07.
- Church, G.M. y Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 81(7), 1991-1995. doi: 10.1073/pnas.81.7.1991.
- Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63(2), 317-327.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5366214>.
- Cohen, B.L. (1973). Growth of *Aspergillus nidulans* in a thin liquid layer. *J Gen Microbiol* 76(2), 277-282. doi: 10.1099/00221287-76-2-277.
- Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A. y Ugalde, U. (2011). Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* 6(3), e17505. doi: 10.1371/journal.pone.0017505 [doi].
- Cove, D.J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 113(1), 51-56. doi: 10.1016/S0926-6593(66)80120-0.
- D'Souza, C.A., Lee, B.N. y Adams, T.H. (2001). Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 158(3), 1027-1036. <http://www.genetics.org/content/158/3/1027.long>.

- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1), 130-135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- Demain, A.L. y Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69, 1-39. doi: 10.1007/3-540-44964-7_1.
- Doskočilová, A., Plíhal, O., Volc, J., Chumová, J., Kourová, H., Halada, P., et al. (2011). A nodulin/glutamine synthetase-like fusion protein is implicated in the regulation of root morphogenesis and in signalling triggered by flagellin. *Planta* 234(3), 459-476. doi: 10.1007/s00425-011-1419-7.
- Durrens, P., Nikolski, M. y Sherman, D. (2008). Fusion and fission of genes define a metric between fungal genomes. *PLoS Comput Biol* 4(10), e1000200. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000200.
- Eisenberg, D., Almassy, R.J., Janson, C.A., Chapman, M.S., Suh, S.W., Cascio, D., et al. (1987). Some evolutionary relationships of the primary biological catalysts glutamine synthetase and RuBisCO. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 52, 483-490. doi: 10.1101/sqb.1987.052.01.055.
- Eisenberg, D., Gill, H.S., Pfluegl, G.M. y Rotstein, S.H. (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2), 122-145. doi: 10.1016/s0167-4838(99)00270-8.
- El-Defrawy, M.M.H. y Hesham, A.E. (2020). "G-protein-coupled Receptors in Fungi," in *Fungal Biotechnology and Bioengineering*, eds. A.L. Hesham, R. Upadhyay, G. Sharma, C. Manoharachary & V. Gupta. (Cham: Springer International Publishing), 37-126.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A. y Ugalde, U. (2010a). *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology* 18(12), 569-576. doi: 10.1016/j.tim.2010.09.007.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araujo-Bazan, L., Rodriguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U., et al. (2009). The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 73(5), 775-789. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06804.x.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Cortese, M.S., Garzia, A., Oiartzabal-Arano, E., de los Rios, V., et al. (2012). GmcA is a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 7(7), e40292. doi: 10.1371/journal.pone.0040292.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., et al. (2008). Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 7(1), 38-48. doi: EC.00207-07 [pii];10.1128/EC.00207-07 [doi].
- Etxebeste, O., Ugalde, U. y Espeso, E.A. (2010b). Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* 11(8), 704-718. doi: CPPS-95 [pii].

- Fischer, M.S. y Glass, N.L. (2019). Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. *Front Microbiol* 10, 619. doi: 10.3389/fmicb.2019.00619.
- Galagan, J.E. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438(7071), 1105-1115. doi: 10.1038/nature04341.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E.A. y Ugalde, U. (2009). *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Molecular Microbiology* 71(1), 172-184. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06520.x.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U. y Espeso, E.A. (2010). The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75(5), 1314-1324. doi: MMI7063 [pii];10.1111/j.1365-2958.2010.07063.x [doi].
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. y Samson, R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59, 1-10. doi: 10.3114/sim.2007.59.01.
- Gifford, D.R. y Schoustra, S.E. (2013). Modelling colony population growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J Theor Biol* 320, 124-130. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.12.003.
- Gill, H.S. y Eisenberg, D. (2001). The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. *Biochemistry* 40(7), 1903-1912. doi: 10.1021/bi002438h.
- Gill, H.S., Pfluegl, G.M. y Eisenberg, D. (2002). Multicopy Crystallographic Refinement of a Relaxed Glutamine Synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* Highlights Flexible Loops in the Enzymatic Mechanism and Its Regulation. *Biochemistry* 41(31), 9863-9872. doi: 10.1021/bi020254s.
- Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallinas, G. y Scazzocchio, C. (2011). Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 48(8), 840-848. doi: 10.1016/j.fgb.2011.03.004.
- Grubbs, F.E. (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11(1), 1-21. doi: 10.1080/00401706.1969.10490657.
- Guerriero, G., Silvestrini, L., Legay, S., Maixner, F., Sulyok, M., Hausman, J.F., et al. (2017). Deletion of the *celA* gene in *Aspergillus nidulans* triggers overexpression of secondary metabolite biosynthetic genes. *Sci Rep* 7(1), 5978. doi: 10.1038/s41598-017-05920-x.
- Guzmán-de-Peña, D., Aguirre, J. y Ruiz-Herrera, J. (1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(2), 199-205. doi: 10.1023/A:1000820221945.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557-580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.

- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J.Y., et al. (2016). OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* 12(1), 281-296. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00864.
- Harris, S.D. (2001). Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol* 4(6), 736-739. doi: S1369-5274(01)00276-4 [pii].
- Hayward, D., van Helden, P.D. y Wiid, I.J. (2009). Glutamine synthetase sequence evolution in the mycobacteria and their use as molecular markers for Actinobacteria speciation. *BMC Evol Biol* 9, 48. doi: 10.1186/1471-2148-9-48.
- Hernick, M. y Fierke, C. (2013). "Mechanisms of Metal-Dependent Hydrolases in Metabolism," in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier).
- Hervás-Aguilar, A. y Peñalva, M.A. (2010). Endocytic Machinery Protein SlaB is Dispensable for Polarity Establishment but Necessary for Polarity Maintenance in Hyphal Tip Cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 9(10), 1504-1518. doi: 10.1128/EC.00119-10.
- Hickey, P.C., Jacobson, D., Read, N.D. y Louise Glass, N.L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal. Genet. Biol* 37(1), 109-119. doi: S108718450200035X [pii].
- Hill, T.W. y Käfer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports* 48. doi: <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173>.
- Holm, L. y Sander, C. (1997). An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins* 28(1), 72-82. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199705)28:1%3C72::AID-PROT7%3E3.0.CO;2-L.
- Hsieh, Y.C., Chen, M.C., Hsu, C.C., Chan, S.I., Yang, Y.S. y Chen, C.J. (2013). Crystal Structures of Vertebrate Dihydropyrimidinase and Complexes from *Tetraodon nigroviridis* with Lysine Carbamylation METAL AND STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION AND FUNCTION. *Journal of Biological Chemistry* 288(42), 30645-30658. doi: 10.1074/jbc.M113.496778.
- Huang, X., Holden, H.M. y Raushel, F.M. (2001). Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 70, 149-180. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.149.
- Huang, X.Q., Hardison, R.C. y Miller, W. (1990). A space-efficient algorithm for local similarities. *Comput Appl Biosci* 6(4), 373-381. doi: 10.1093/bioinformatics/6.4.373.
- Huberts, D.H. y van der Klei, I.J. (2010). Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* 1803(4), 520-525. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.
- Hussein, M.J., Green, J.M. y Nichols, B.P. (1998). Characterization of mutations that allow p-aminobenzoyl-glutamate utilization by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(23), 6260-6268. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829935>.

- Jacobson, M.P., Pincus, D.L., Rapp, C.S., Day, T.J.F., Honig, B., Shaw, D.E., et al. (2004). A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction. *Proteins* 55(2), 351-367. doi: 10.1002/prot.10613.
- Jain, S., Wiemann, P., Thill, E., Williams, B., Keller, N.P. y Kabbage, M. (2018). A Bcl-2 Associated Athanogene (*bagA*) Modulates Sexual Development and Secondary Metabolism in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* 9, 1316. doi: 10.3389/fmicb.2018.01316.
- Jedd, G. y Pieuchot, L. (2012). Multiple modes for gatekeeping at fungal cell-to-cell channels. *Mol Microbiol* 86(6), 1291-1294. doi: 10.1111/mmi.12074.
- Jin, Y., Bok, J.W., Guzmán-de-Peña, D. y Keller, N.P. (2002). Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 46(3), 801-812. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03201.x.
- Joo, H.K., Park, Y.W., Jang, Y.Y. y Lee, J.Y. (2018). Structural Analysis of Glutamine Synthetase from *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* 8(1), 11657. doi: 10.1038/s41598-018-30191-5.
- Käfer, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52(1), 217-232. <http://www.genetics.org/content/52/1/217.long>.
- Kappaun, K., Piovesan, A.R., Carlini, C.R. y Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties - A review. *J Adv Res* 13, 3-17. doi: 10.1016/j.jare.2018.05.010.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H. y Igarashi, K. (1992). Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10), 4529-4533. doi: 10.1073/pnas.89.10.4529.
- Kato, N., Brooks, W. y Calvo, A.M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* 2(6), 1178-1186. doi: 10.1128/ec.2.6.1178-1186.2003.
- Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3(12), 937-947. doi: 10.1038/nrmicro1286.
- Kersey, P.J., Allen, J.E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B.J., et al. (2018). Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research* 46(D1), D802-D808. doi: 10.1093/nar/gkx1011.
- Kikuma, T., Arioka, M. y Kitamoto, K. (2007). Autophagy during conidiation and conidial germination in filamentous fungi. *Autophagy* 3(2), 128-129. doi: 10.4161/auto.3560.
- Kikuma, T. y Kitamoto, K. (2011). Analysis of autophagy in *Aspergillus oryzae* by disruption of *Aoatg13*, *Aoatg4* and *Aoatg15* genes. *FEMS Microbiol Lett* 316(1), 61-69. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02192.x.
- Kikuma, T., Ohneda, M., Arioka, M. y Kitamoto, K. (2006). Functional analysis of the ATG8 homologue *Aoatg8* and role of autophagy in differentiation and

- germination in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* 5(8), 1328-1336. doi: 10.1128/EC.00024-06.
- Kikuma, T., Tadokoro, T., Maruyama, J.I. y Kitamoto, K. (2017). *AoAtg26*, a putative sterol glucosyltransferase, is required for autophagic degradation of peroxisomes, mitochondria, and nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 81(2), 384-395. doi: 10.1080/09168451.2016.1240603.
- Kim, G.J. y Kim, H.S. (1998). Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring. *Biochemical Journal* 330 (Pt 1), 295-302. doi: 10.1042/bj3300295.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. y Chae, K. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 37(1), 72-80. doi: S1087184502000294 [pii].
- Kim, J.M., Song, H.Y., Choi, H.J., So, K.K., Kim, D.H., Chae, K.S., et al. (2015). Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of *Aspergillus nidulans*, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development. *J Microbiol* 53(1), 21-31. doi: 10.1007/s12275-015-4657-8.
- Kim, M.J., Lee, M.K., Pham, H.Q., Gu, M.J., Zhu, B., Son, S.H., et al. (2020). The velvet Regulator VosA Governs Survival and Secondary Metabolism of Sexual Spores in *Aspergillus nidulans*. *Genes (Basel)* 11(1). doi: 10.3390/genes11010103.
- Kimura, K., Suzuki, H. y Nakano, Y. (1988). Regulation of Glutamine Synthetase Activity by Phosphorylation instead of by Adenylylation. *Biochem Biophys Res Commun* 155(3), 1133-1138. doi: 10.1016/s0006-291x(88)81258-0
- Kjaerbolling, I., Mortensen, U.H., Vesth, T. y Andersen, M.R. (2019). Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genet Biol* 130, 107-121. doi: 10.1016/j.fgb.2019.06.001.
- Klaenhammer, T.R. (1984). A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Current Microbiology* 10(1), 23-28. doi: 10.1007/BF01576043.
- Klejnstrup, M.L., Frandsen, R.J., Holm, D.K., Nielsen, M.T., Mortensen, U.H., Larsen, T.O., et al. (2012). Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites* 2(1), 100-133. doi: 10.3390/metabo2010100.
- Korbie, D.J. y Mattick, J.S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* 3(9), 1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
- Krajewski, W.W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T.A., Karlberg, T. y Mowbray, S.L. (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol* 375(1), 217-228. doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.029.
- Krohn, N.G., Brown, N.A., Colabardini, A.C., Reis, T., Savoldi, M., Dinamarco, T.M., et al. (2014). The *Aspergillus nidulans* ATM kinase regulates mitochondrial

- function, glucose uptake and the carbon starvation response. *G3 (Bethesda)* 4(1), 49-62. doi: 10.1534/g3.113.008607.
- Krysenko, S., Matthews, A., Okoniewski, N., Kulik, A., Girbas, M.G., Tsyplik, O., et al. (2019). Initial Metabolic Step of a Novel Ethanolamine Utilization Pathway and Its Regulation in *Streptomyces coelicolor* M145. *mBio* 10(3). doi: 10.1128/mBio.00326-19.
- Krysenko, S., Okoniewski, N., Kulik, A., Matthews, A., Grimpo, J., Wohlleben, W., et al. (2017). Gamma-Glutamylpolyamine Synthetase GlnA3 Is Involved in the First Step of Polyamine Degradation Pathway in *Streptomyces coelicolor* M145. *Frontiers in Microbiology* 8(-), 726-744. doi: 10.3389/fmicb.2017.00726.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Kurihara, S., Oda, S., Kumagai, H. y Suzuki, H. (2006). Gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 256(2), 318-323. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00137.x.
- Kurihara, S., Oda, S., Tsuboi, Y., Kim, H.G., Oshida, M., Kumagai, H., et al. (2008). γ -Glutamylputrescine Synthetase in the Putrescine Utilization Pathway of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* 283(29), 19981-19990. doi: 10.1074/jbc.M800133200.
- Kwon, N.J., Shin, K.S. y Yu, J.H. (2010). Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol* 47(12), 981-993. doi: S1087-1845(10)00172-6 [pii];10.1016/j.fgb.2010.08.009 [doi].
- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. y Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design & Selection* 17(6), 527-536. doi: 10.1093/protein/gzh062.
- Ladner, J.E., Atanasova, V., Dolezelova, Z. y Parsons, J.F. (2012). Structure and Activity of PA5508, a Hexameric Glutamine Synthetase Homologue. *Biochemistry* 51(51), 10121-10123. doi: 10.1021/bi3014856.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lafon, A., Seo, J.A., Han, K.H., Yu, J.H. y D'Enfert, C. (2005). The heterotrimeric G-protein GanB(α)-SfaD(β)-GpgA(γ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 171(1), 71-80. doi: genetics.105.040584 [pii];10.1534/genetics.105.040584 [doi].
- Lapage, S.P., Shelton, J.E. y Mitchell, T.G. (1970). "Media for the Maintenance and Preservation of Bacteria," in *Methods in Microbiology*, eds. N.J. R. & R.D. W. (London and New York: Academic Press), 1-505.
- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1994). The *Aspergillus nidulans* *fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes & Development* 8(6), 641-651. doi: 10.1101/gad.8.6.641.

- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1996). *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *The EMBO Journal* 15(2), 299-309.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00360.x/full>.
- Leonard, G. y Richards, T.A. (2012). Genome-scale comparative analysis of gene fusions, gene fissions, and the fungal tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(52), 21402-21407. doi: 10.1073/pnas.1210909110.
- Letunic, I. y Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47(W1), W256-W259. doi: 10.1093/nar/gkz239.
- Levin, A.M., de Vries, R.P., Conesa, A., de Bekker, C., Talon, M., Menke, H.H., et al. (2007). Spatial Differentiation in the Vegetative Mycelium of *Aspergillus niger*. *Eukaryot Cell* 6(12), 2311-2322. doi: 10.1128/EC.00244-07.
- Li, H.X., Lu, Z.M., Zhu, Q., Gong, J.S., Geng, Y., Shi, J.S., et al. (2017). Comparative Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal a FluG-Mediated Signaling Pathway Relating to Asexual Sporulation of *Antrodia camphorata*. *Proteomics* 17(17-18). doi: 10.1002/pmic.201700256.
- Li, L., Wright, S.J., Krystofova, S., Park, G. y Borkovich, K.A. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology* 61(1), 423-452. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093432.
- Li, T., Iwaki, H., Fu, R., Hasegawa, Y., Zhang, H. y Liu, A. (2006). α -amino- β -carboxymuconic- ϵ -semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) Is a New Member of the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry* 45(21), 6628-6634. doi: 10.1021/bi060108c.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., et al. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research* 43(W1), W580-W584. doi: 10.1093/nar/gkv279.
- Lo, H.C., Entwistle, R., Guo, C.J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J.H., et al. (2012). Two Separate Gene Clusters Encode the Biosynthetic Pathway for the Meroterpenoids Austinol and Dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc* 134(10), 4709-4720. doi: 10.1021/ja209809t.
- Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C. y Davies, R.W. (1985). Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 33(2), 137-149. doi: 10.1016/0378-1119(85)90088-5.
- Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J. y Dobritzsch, D. (2006). The Crystal Structures of Dihydropyrimidinases Reaffirm the Close Relationship Between Cyclic Amidohydrolases and Explain Their Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry* 281(19), 13762-13776. doi: 10.1074/jbc.M513266200.
- Long, M. (2000). A new function evolved from gene fusion. *Genome Res* 10(11), 1655-1657. doi: 10.1101/gr.165700.
- Lu, C.D., Itoh, Y., Nakada, Y. y Jiang, Y. (2002). Functional Analysis and Regulation of the Divergent *spuABCDEFHG-spul* Operons for Polyamine Uptake and

- Utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 184(14), 3765-3773. doi: 10.1128/JB.184.14.3765-3773.2002.
- Luengo, J.M. y Olivera, E.R. (2020). Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 22(4), 1174-1192. doi: 10.1111/1462-2920.14912.
- Mah, J.H. y Yu, J.H. (2006). Upstream and Downstream Regulation of Asexual Development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 5(10), 1585-1595. doi: 10.1128/EC.00192-06.
- Margelis, S., D'Souza, C., Small, A.J., Hynes, M.J., Adams, T.H. y Davis, M.A. (2001). Role of Glutamine Synthetase in Nitrogen Metabolite Repression in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 183(20), 5826-5833. doi: 10.1128/JB.183.20.5826-5833.2001.
- Márquez-Fernández, O., Trigos, Á., Ramos-Balderas, J.L., Viniegra-González, G., Deising, H.B. y Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl Transferase CfwA/NpgA Is Required for *Aspergillus nidulans* Secondary Metabolism and Asexual Development. *Eukaryot Cell* 6(4), 710-720. doi: 10.1128/EC.00362-06.
- Martinelli, S.D. (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Prog Ind Microbiol* 29, 33-58. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765132>.
- Martinelli, S.D. y Clutterbuck, A.J. (1971). A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 69(2), 261-268. doi: 10.1099/00221287-69-2-261
- Martinez-Rodriguez, S., Martinez-Gomez, A.I., Clemente-Jimenez, J.M., Rodriguez-Vico, F., Garcia-Ruiz, J.M., Las Heras-Vazquez, F.J., et al. (2010). Structure of dihydropyrimidinase from *Sinorhizobium meliloti* CECT4114: new features in an amidohydrolase family member. *J Struct Biol* 169(2), 200-208. doi: 10.1016/j.jsb.2009.10.013.
- Masai, K., Maruyama, J., Sakamoto, K., Nakajima, H., Akita, O. y Kitamoto, K. (2006). Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 71(6), 881-891. doi: 10.1007/s00253-006-0429-z.
- Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y. y Cullimore, J.V. (2000). The Presence of GSI-Like Genes in Higher Plants: Support for the Paralogous Evolution of GSI and GSII Genes. *Journal of Molecular Evolution* 50(2), 116-122. doi: 10.1007/s002399910013.
- Mathis, R., Grosjean, C., de Billy, F., Huguet, T. y Gamas, P. (1999). The Early Nodulin Gene *MtN6* is a Novel Marker for Events Preceding Infection of *Medicago truncatula* Roots by *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(6), 544-555. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.6.544.
- Matsuda, Y., Awakawa, T., Wakimoto, T. y Abe, I. (2013). Spiro-Ring Formation is Catalyzed by a Multifunctional Dioxygenase in Austinol Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc* 135(30), 10962-10965. doi: 10.1021/ja405518u.
- McCluskey, K., Wiest, A. y Plamann, M. (2010). The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research. *J Biosci* 35(1), 119-126. doi: 10.1007/s12038-010-0014-6.

- Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B. y Solomon, P.S. (2013). Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One* 8(11), e78368. doi: 10.1371/journal.pone.0078368.
- Medema, M.H. y Fischbach, M.A. (2015). Computational approaches to natural product discovery. *Nat Chem Biol* 11(9), 639-648. doi: 10.1038/nchembio.1884.
- Mehmood, A., Liu, G., Wang, X., Meng, G., Wang, C. y Liu, Y. (2019). Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. *Molecules* 24(10). doi: 10.3390/molecules24101950.
- Miller, B. (1990). The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. *Semin Dev Biol* 1, 207-219.
- Miller, B.L., Wu, J. y Miller, K.Y. (1993). "The *medA* gene of *Aspergillus nidulans*", in: *J. Cell. Biochem.*
- Miller, K.Y., Wu, J. y Miller, B.L. (1992). *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* 6(9), 1770-1782.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1516832>.
- Mims, C.W., Richardson, E.A. y Timberlake, W.E. (1988). Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* 144, 132-141. doi: 10.1007/BF01637246.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol* 5(6), 580-585. doi: S1369527402003685 [pii].
- Mooney, J.L. y Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4(9), 1473-1482.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253875>.
- Moore, B. (2004). Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant Sci* 9(5), 221-228. doi: 10.1016/j.tplants.2004.03.005.
- Morton, A.G. (1961). "The induction of sporulation in mould fungi", in: *Proc. R. Microsp. Soc. B.*
- Murray, D.S., Chinnam, N., Tonthat, N.K., Whitfill, T., Wray, L.V., Jr., Fisher, S.H., et al. (2013). Structures of the *Bacillus subtilis* Glutamine Synthetase Dodecamer Reveal Large Intersubunit Catalytic Conformational Changes Linked to a Unique Feedback Inhibition Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 288(50), 35801-35811. doi: 10.1074/jbc.M113.519496.
- Nam, S.H., Park, H.S. y Kim, H.S. (2005). Evolutionary Relationship and Application of a Superfamily of Cyclic Amidohydrolase Enzymes. *The Chemical Record* 5(5), 298-307. doi: 10.1002/tcr.20057.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., et al. (2006). A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172(3), 1557-1566. doi: 10.1534/genetics.105.052563.
- Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N. y Moses, A.M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202.
- Nguyen, T.T., Fedorov, A.A., Williams, L., Fedorov, E.V., Li, Y., Xu, C., et al. (2009). The Mechanism of the Reaction Catalyzed by Uronate Isomerase Illustrates

- How an Isomerase May Have Evolved from a Hydrolase within the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry* 48(37), 8879-8890. doi: 10.1021/bi901046x
- Ni, M., Gao, N., Kwon, N.J., Shin, K.S. y Yu, J.H. (2010). "Regulation of *Aspergillus* Conidiation," in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, eds. K.A. Borkovich & D.J. Ebbole. (Washington DC: ASM Press), 559-576.
- Nielsen, H. (2017). "Predicting Secretory Proteins with SignalP," in *Protein Function Prediction*, ed. D. Kihara. 1 ed (New York, NY: Humana Press), 59-73.
- Nielsen, K.F. y Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* 1002(1-2), 111-136. doi: 10.1016/s0021-9673(03)00490-4.
- Nielsen, M.L., Nielsen, J.B., Rank, C., Klejnstrup, M.L., Holm, D.K., Brogaard, K.H., et al. (2011). A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett* 321(2), 157-166. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02327.x.
- Noble, L.M. y Andrianopoulos, A. (2013). Reproductive competence: a recurrent logic module in eukaryotic development. *Proc Biol Sci* 280(1766), 20130819. doi: 10.1098/rspb.2013.0819.
- Oakley, B.R., Rinehart, J.E., Mitchell, B.L., Oakley, C.E., Carmona, C., Gray, G.L., et al. (1987). Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 61(3), 385-399. doi: 10.1016/0378-1119(87)90201-0.
- Oberegger, H., Eisendle, M., Schrettl, M., Graessle, S. y Haas, H. (2003). 4'-phosphopantetheinyl transferase-encoding *npgA* is essential for siderophore biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 44(4), 211-215. doi: 10.1007/s00294-003-0434-z.
- Oestreicher, N., Ribard, C. y Scazzocchio, C. (2008). The *nadA* gene of *Aspergillus nidulans*, encoding adenine deaminase, is subject to a unique regulatory pattern. *Fungal Genet Biol* 45(5), 760-775. doi: 10.1016/j.fgb.2007.10.015.
- Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F.J., Takahashi, T. y Koyama, Y. (2010). Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in *koji*-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 47(1), 10-18. doi: 10.1016/j.fgb.2009.10.004.
- Pan, X., Yu, J., Du, Q., Zeng, S., Liu, J., Jiao, Q., et al. (2020). Efficient synthesis of γ -glutamyl compounds by co-expression of γ -glutamylmethylamide synthetase and polyphosphate kinase in engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 47(8), 573-583. doi: 10.1007/s10295-020-02305-4.
- Park, H.S. y Yu, J.H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol* 15(6), 669-677. doi: S1369-5274(12)00122-1 [pii];10.1016/j.mib.2012.09.006 [doi].
- Peñalva, M.A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* 42(12), 963-975. doi: 10.1016/j.fgb.2005.09.004.

- Perham, R.N. (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem* 69, 961-1004. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.961.
- Perteau, M., Ayanbule, K., Smedinghoff, M. y Salzberg, S.L. (2009). OperonDB: a comprehensive database of predicted operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue), D479-482. doi: 10.1093/nar/gkn784.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A. y Penalva, M.A. (2013). Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement. *Autophagy* 9(7), 1024-1043. doi: 10.4161/auto.24483.
- Plotkin, J.B. y Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12(1), 32-42. doi: 10.1038/nrg2899.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D. y Bufton, A.W.J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5, 141-238. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60408-3.
- Purschwitz, J., Muller, S. y Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol. Genet. Genomics* 281(1), 35-42. doi: 10.1007/s00438-008-0390-x [doi].
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., et al. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol* 18(4), 255-259. doi: S0960-9822(08)00159-0 [pii];10.1016/j.cub.2008.01.061 [doi].
- Rechsteiner, M. y Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21(7), 267-271. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10031-1.
- Reitzer, L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 57, 155-176. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
- Rexer, H.U., Schäberle, T., Wohlleben, W. y Engels, A. (2006). Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of Microbiology* 186, 447-458. doi: 10.1007/s00203-006-0159-8.
- Richie, D.L., Fuller, K.K., Fortwendel, J., Miley, M.D., McCarthy, J.W., Feldmesser, M., et al. (2007). Unexpected link between metal ion deficiency and autophagy in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 6(12), 2437-2447. doi: 10.1128/EC.00224-07.
- Riquelme, M., Fischer, R. y Bartnicki-Garcia, S. (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* 222(3-4), 211-215. doi: 10.1007/s00709-003-0020-8.
- Rocha, R.O. y Wilson, R.A. (2019). Essential, deadly, enigmatic: Polyamine metabolism and roles in fungal cells. *Fungal Biology Reviews* 33(1), 47-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.07.003>.

- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S. y Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol* 64, 585-610. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134000 [doi].
- Rodríguez-Urra, A.B., Jimenez, C., Nieto, M.I., Rodríguez, J., Hayashi, H. y Ugalde, U. (2012). Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol* 7(3), 599-606. doi: 10.1021/cb200455u [doi].
- Roper, M., Lee, C., Hickey, P.C. y Gladfelter, A.S. (2015). Life as a moving fluid: fate of cytoplasmic macromolecules in dynamic fungal syncytia. *Curr Opin Microbiol* 26, 116-122. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.001.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 12(2), 85-94. doi: 10.1093/protein/12.2.85.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M., et al. (2011). Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188(4), 809-822. doi: 10.1534/genetics.111.130096.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4), 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sastry, G.M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. y Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 27(3), 221-234. doi: 10.1007/s10822-013-9644-8.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schnackerz, K.D. y Dobritzsch, D. (2008). Amidohydrolases of the reductive pyrimidine catabolic pathway purification, characterization, structure, reaction mechanisms and enzyme deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1784(3), 431-444. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.01.005.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., et al. (2015). The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(6), 659-674. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0411-R.
- Sealy-Lewis, H.M. y Lockington, R.A. (1984). Regulation of two alcohol dehydrogenases in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 8(4), 253-259. doi: 10.1007/BF00419721.
- Seibert, C.M. y Raushel, F.M. (2005). Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry* 44(17), 6383-6391. doi: 10.1021/bi047326v.

- Seo, J.A., Guan, Y. y Yu, J.H. (2003). Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 165(3), 1083-1093. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668366>.
- Serlupi-Crescenzi, O., Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1983). Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 129(11), 3535-3544. doi: 10.1099/00221287-129-11-3535.
- Sewall, T.C., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990a). *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2(8), 731-739. doi: 10.1105/tpc.2.8.731 [doi];2/8/731 [pii].
- Sewall, T.C., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990b). Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev. Biol* 138(2), 499-508. doi: 0012-1606(90)90215-5 [pii].
- Shelley, J.C., Cholleti, A., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Timlin, M.R. y Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 21(12), 681-691. doi: 10.1007/s10822-007-9133-z.
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J. y Sherman, W. (2010). Prediction of Absolute Solvation Free Energies Using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* 6(5), 1509-1519. doi: 10.1021/ct900587b.
- Shoji, J.Y., Kikuma, T., Arioka, M. y Kitamoto, K. (2010). Macroautophagy-mediated degradation of whole nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* 5(12), e15650. doi: 10.1371/journal.pone.0015650.
- Silva, L.S., Seabra, A.R., Leitão, J.N. y Carvalho, H.G. (2015). Possible role of glutamine synthetase of the prokaryotic type (GSI-like) in nitrogen signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Science* 240, 98-108. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.001.
- Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141 (Pt 1), 21-28. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-141-1-21>.
- Sneath, P.H.A. (1955). Putrescine as an Essential Growth Factor for a Mutant of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 175(4462), 818-818. doi: 10.1038/175818a0.
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O. y Aguirre, J. (2006). TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 59(3), 854-869. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04996.x.
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O., Ramos-Balderas, J.L. y Aguirre, J. (2016). The Adenylate-Forming Enzymes AfeA and TmpB Are Involved in *Aspergillus nidulans* Self-Communication during Asexual Development. *Front Microbiol* 7, 353. doi: 10.3389/fmicb.2016.00353.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G. y Krogh, A. (Year). "A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences", in: *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*,

- eds. J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff & C. Sensen (Menlo Park, CA: AAAI Press), 175-182.
- Stadtman, E. y Ginsburg, A. (1974). "The Glutamine Synthetase of *Escherichia coli*: Structure and Control," in *The Enzymes*, ed. B. PD. (New York: Academic Press, Inc.), 755-807.
- Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L. y Calvo, A.M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol* 63(1), 242-255. doi: MMI5506 [pii];10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x [doi].
- Strong, M., Mallick, P., Pellegrini, M., Thompson, M.J. y Eisenberg, D. (2003). Inference of protein function and protein linkages in *Mycobacterium tuberculosis* based on prokaryotic genome organization: a combined computational approach. *Genome Biology* 4(9), R59. doi: 10.1186/gb-2003-4-9-r59.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., et al. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* 1(6), 3111-3120. doi: 10.1038/nprot.2006.405.
- Taboada, B., Ciria, R., Martinez-Guerrero, C.E. y Merino, E. (2012). ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue), D627-631. doi: 10.1093/nar/gkr1020.
- Takeo, M., Ohara, A., Sakae, S., Okamoto, Y., Kitamura, C., Kato, D., et al. (2013). Function of a Glutamine Synthetase-Like Protein in Bacterial Aniline Oxidation via γ -Glutamylanilide. *Journal of Bacteriology* 195(19), 4406-4414. doi: 10.1128/JB.00397-13.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. y Fischer, R. (2008). Apical Sterol-Rich Membranes Are Essential for Localizing Cell End Markers That Determine Growth Directionality in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* 19(1), 339-351. doi: 10.1091/mbc.E07-06-0523.
- Taylor, J., Bowman, B., Berbee, M.L. y White, T.J. (1993). Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. *Systematic Biology* 42, 18. doi: 10.2307/2992483
- Thieme, K.G., Gerke, J., Sasse, C., Valerius, O., Thieme, S., Karimi, R., et al. (2018). Velvet domain protein VosA represses the zinc cluster transcription factor ScIB regulatory network for *Aspergillus nidulans* asexual development, oxidative stress response and secondary metabolism. *PLoS Genet* 14(8), e1007638. doi: 10.1371/journal.pgen.1007638.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. y Davies, R.W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26(2-3), 205-221. doi: 10.1016/0378-1119(83)90191-9.
- Trevaskis, B., Wandrey, M., Colebatch, G. y Udvardi, M.K. (2002). The Soybean *GmN6L* Gene Encodes a Late Nodulin Expressed in the Infected Zone of Nitrogen-Fixing Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(7), 630-636. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.7.630.

- Trinci, A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol* 57(1), 11-24.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5822157>.
- Trinci, A.P.J. (1970). Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*. *Archiv für Mikrobiologie volume 73*, 353-367. doi: 10.1007/BF00412302.
- Trujillo, A.C.G. (2019). Study of a new signaling protein in nitrogen metabolism in the model legume *Medicago truncatula Gaert.*
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. y Keller, N.P. (2005). Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 151(Pt 6), 1809-1821. doi: 151/6/1809 [pii];10.1099/mic.0.27880-0 [doi].
- Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., et al. (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J Biol Chem* 281(39), 29287-29296. doi: 10.1074/jbc.M601497200.
- van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V. y Booger, F.C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(4), 628-695. doi: 10.1128/MMBR.00025-13.
- van Rooyen, J.M., Abratt, V.R., Belrhali, H. y Sewell, T. (2011). Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* 19(4), 471-483. doi: 10.1016/j.str.2011.02.001.
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D. y Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 6(9), 1570-1583. doi: 10.1128/EC.00085-07.
- Wang, F., Krijgsheld, P., Hulsman, M., de Bekker, C., Müller, W.H., Reinders, M., et al. (2015). FluG affects secretion in colonies of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107(1), 225-240. doi: 10.1007/s10482-014-0321-2.
- Wang, N., Chen, X.L., Gao, C., Peng, M., Wang, P., Zhang, N., et al. (2020). Crystal structures of γ -glutamylmethylamide synthetase provide insight into bacterial metabolism of oceanic monomethylamine. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.RA120.015952.
- Wang, Y., Xu, H., Harich, K.C. y White, R.H. (2014). Identification and characterization of a tyramine-glutamate ligase (MfnD) involved in methanofuran biosynthesis. *Biochemistry* 53(39), 6220-6230. doi: 10.1021/bi500879h.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. y Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9), 1189-1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J., III y Adams, T.H. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 27(1), 62-69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750148>.

- Wissel, M.C., Wendt, J.L., Mitchell, C.J. y Weiss, D.S. (2005). The transmembrane helix of the *Escherichia coli* division protein FtsI localizes to the septal ring. *J Bacteriol* 187(1), 320-328. doi: 10.1128/JB.187.1.320-328.2005.
- Yager, L.N., Lee, H.O., Nagle, D.L. y Zimmerman, J.E. (1998). Analysis of *fluG* Mutations That Affect Light-Dependent Conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149(4), 1777-1786. <http://www.genetics.org/content/genetics/149/4/1777.full.pdf>.
- Yamamoto, S., Wakayama, M. y Tachiki, T. (2008). Cloning and expression of *Methylovorus mays* No. 9 gene encoding gamma-glutamylmethylamide synthetase: an enzyme usable in theanine formation by coupling with the alcoholic fermentation system of baker's yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 72(1), 101-109. doi: 10.1271/bbb.70462.
- Yamashita, M.M., Almasy, R.J., Janson, C.A., Cascio, D. y Eisenberg, D. (1989). Refined Atomic Model of Glutamine Synthetase at 3.5 Å Resolution. *J Biol Chem* 264(30), 17681-17690. <http://www.jbc.org/content/264/30/17681.long>.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C., et al. (2004). Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3(5), 1359-1362. doi: 10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004.
- Yao, X., He, W. y Lu, C.D. (2011). Functional Characterization of Seven γ -Glutamylpolyamine Synthetase Genes and the *bauRABCD* Locus for Polyamine and β -Alanine Utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 193(15), 3923-3930. doi: 10.1128/JB.05105-11.
- Yao, X., Li, C., Zhang, J. y Lu, C.D. (2012). γ -Glutamyl Spermine Synthetase PauA2 as a Potential Target of Antibiotic Development against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(10), 5309-5314. doi: 10.1128/AAC.01158-12.
- Yon-Kahn, J. y Hervé, G. (2010). "Multifunctional Enzymes, Multi-Enzymatic Complexes and Metabolic Channelling," in *Molecular and Cellular Enzymology*. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 679-722.
- Yu, J.H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* 44(2), 145-154. doi: 2371 [pii].
- Yu, J.H., Mah, J.H. y Seo, J.A. (2006). Growth and Developmental Control in the Model and Aathogenic Aspergilli. *Eukaryot. Cell* 5(10), 1577-1584. doi: 10.1128/EC.00193-06.
- Yu, J.H., Wieser, J. y Adams, T.H. (1996). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* 15(19), 5184-5190. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895563>.

ANEXOS

Anexo 1

Se puede apreciar que en el contacto entre la cepa $\Delta fluG$ y $cfwA2$ solo se han generado esporas de color amarillo, y no de color verde pertenecientes a la cepa $\Delta fluG$. Este hecho indica, por un lado, que la transmisión del metabolito puede darse unidireccionalmente desde el mutante nulo de $fluG$ a la cepa $cfwA2$. Por otro lado, la ausencia de esporas verdes en el la cepa $\Delta fluG$ sugieren que el mutante $cfwA2$, el cual contiene el gen $fluG$ intacto, no puede transmitir el metabolito de FluG a la cepa $\Delta fluG$. Estos resultados indican el gen $npgA$ puede tomar parte en la síntesis del metabolito asociado a FluG. La sobreexpresión de $npgA$ tiene efectos tanto en el desarrollo vegetativo, asexual y sexual (Kim et al., 2015). No obstante, teniendo en cuenta que una cepa nula en el gen $npgA$ tiene un fenotipo letal, cabe resaltar que el papel de este gen es más diverso que el de $fluG$ en el desarrollo del hongo.

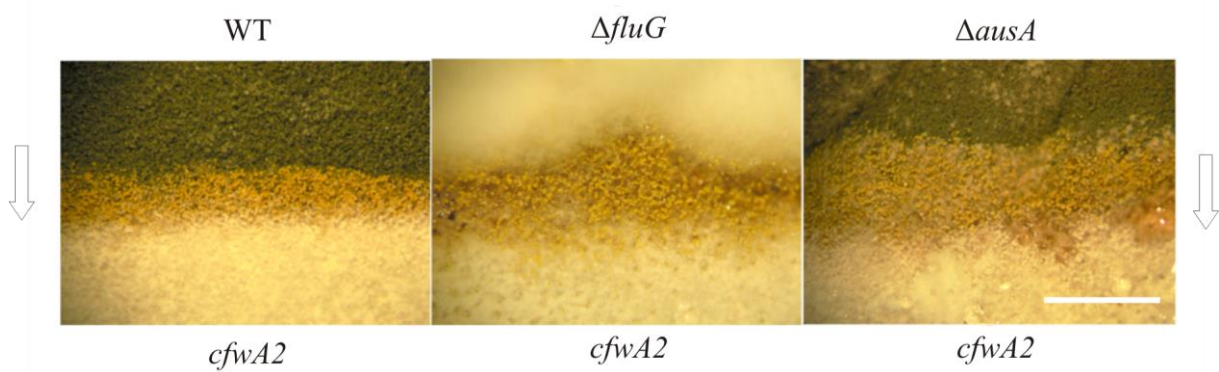
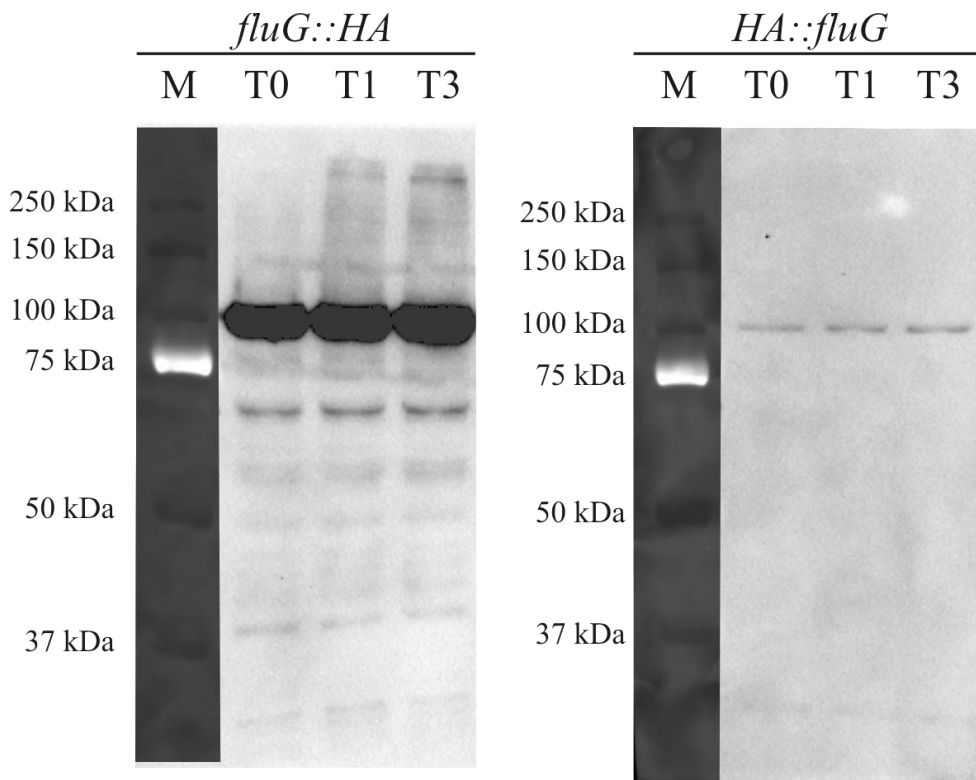


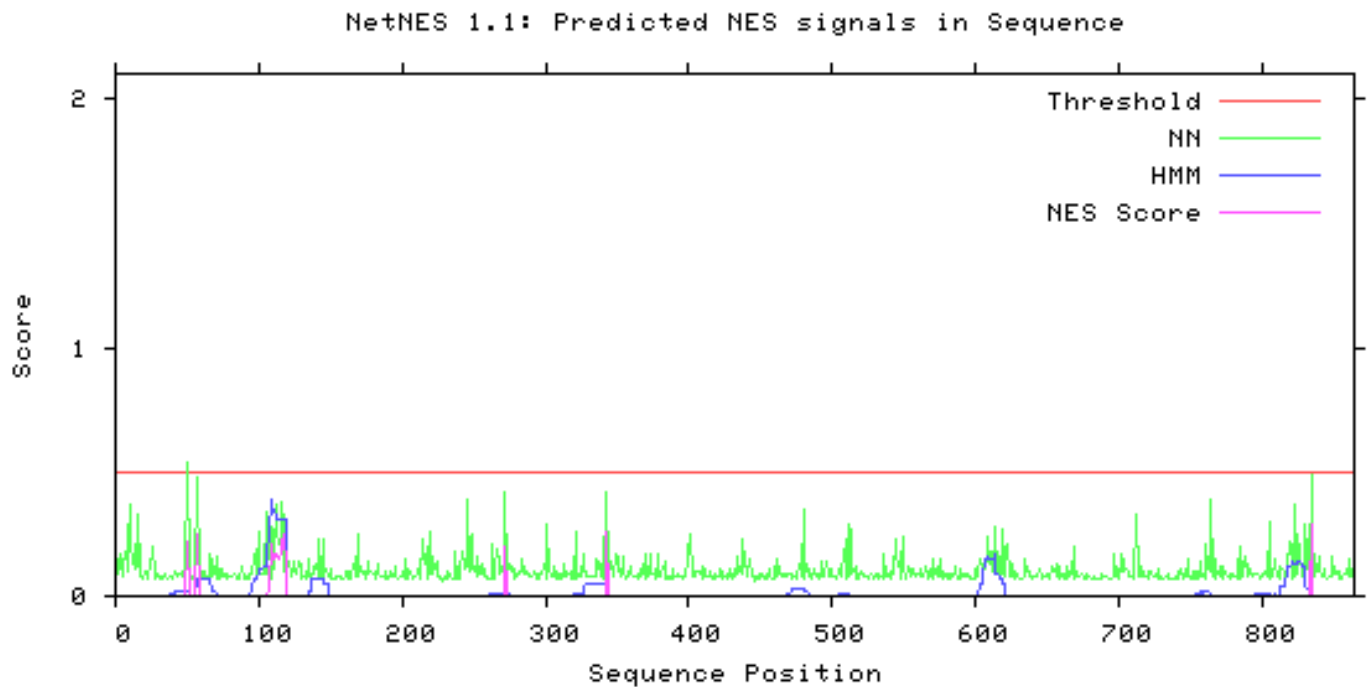
Figura 43. Transmisión de la molécula inductora de la esporulación de una cepa WT, $\Delta ausA$ y $\Delta fluG$ a una cepa $cfwA2$. En todos los experimentos se puede apreciar una banda amarilla perteneciente a la cepa $cfwA2$ en la zona de contacto. La flecha indica la transmisión de la molécula de FluG. Barra de escala = 5 mm

Anexo 2

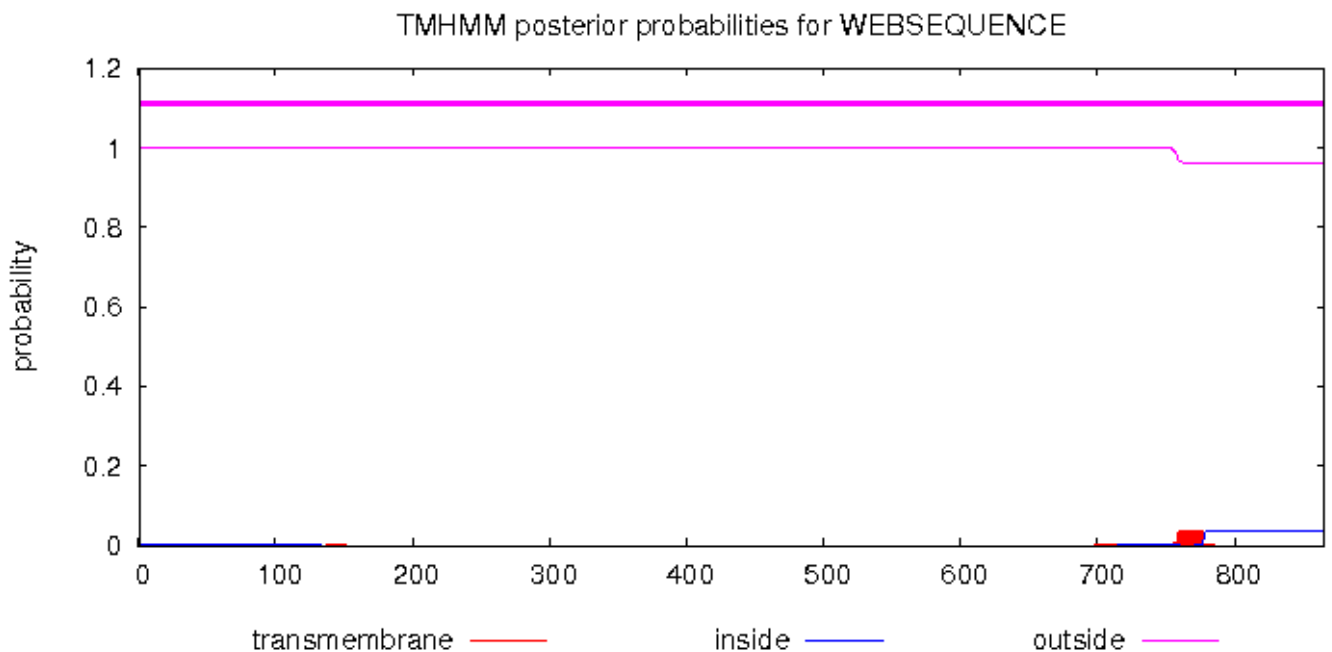
Detección de los etiquetados FluG-HA_{3x} y HA_{3x}-FluG mediante Western blot. En la membrana de la cepa FluG-HA_{3x}, se observó una serie de bandas, siendo la principal y más intensa la correspondiente a la proteína etiquetada FluG-HA_{3x}. Las bandas que se observan por debajo, pueden ser artefactos producidos por degradación de la proteína FluG-HA_{3x}. La cepa HA_{3x}-FluG, en cambio, muestra una única banda correspondiente a su tamaño.



- C. Representación gráfica de la predicción de señales de exportación nuclear obtenido por el predictor NetNES. No se predice que FluG tenga señales de exportación nuclear.

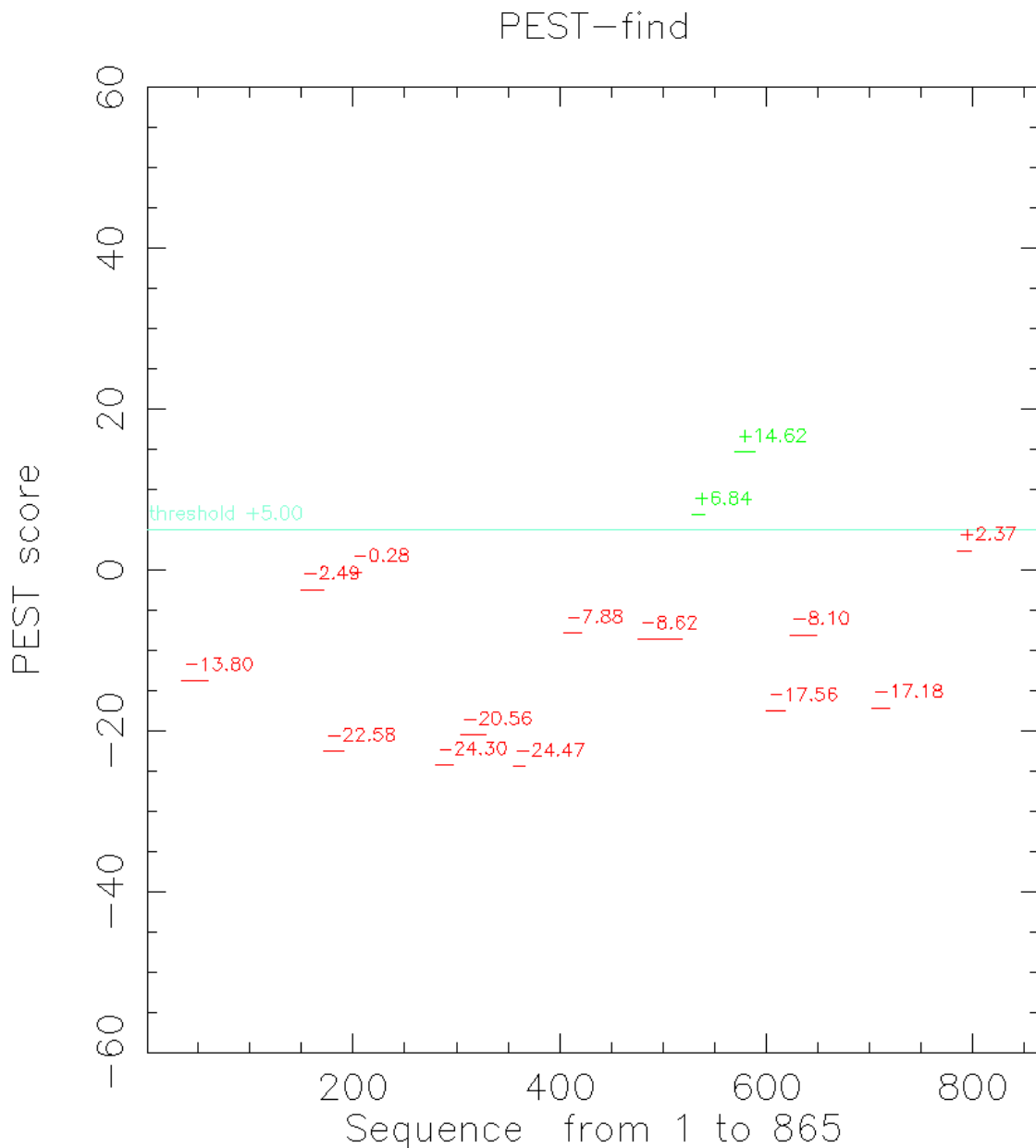


- D. Representación gráfica de la predicción de dominios transmembrana obtenido por el predictor TMHMM. No se predice que FluG tenga dominios transmembrana.



Anexo 4

Representación gráfica de los dominios PEST predichos en la secuencia proteica de FluG (1-865) por el predictor epestfind. Los dominios PEST potenciales están marcados en verde. El primer dominio PEST se encuentra entre las secuencias de aminoácidos 529 y 541 con un score de 6,84, mientras que el segundo se encuentra entre las secuencias de aminoácidos 571 y 590 con un score de 14,62.



Anexo 5

En esta tabla se muestran los resultados del alineamiento de las secuencias proteicas de las enzimas presentes en cada subgrupo (Seibert y Raushel, 2005), con la región N-terminal de FluG. Por un lado, se detalla la conservación de los aminoácidos que se unen a los metales, resaltando en **verde** aquellos aminoácidos que estén conservados en FluG. Por otro lado, se muestra el porcentaje de la identidad de la matriz (PIM) para determinar la similitud de la región N-terminal FluG con la enzima testada.

Subgrupo	Enzima	N° secuencia Uniprot	Residuos alineados								PIM (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	
I	PTE	A0A0F3SPP4	HxH	-	-	K	H	H	-	D	19,42
	DHO	P05020		-	-				-		18,67
	IAD	P39377		-	-				-		23,59
	URE	Q8XAG0		-	-				-		20,60
	HYD	Q46806		-	-				-		20,35
II	PHP	P45548	HxH	-	-	E	H	H	-	D	18,40
III	ADA	P22333	HxH				H	H		D	20,30
	CDA	P25524									18,86
IV	AGD	P0AF18	HxH		E		H	H		D	22,97
V	DAA	A0A1D3KRP4	HxH	C			H	H		D	19,10
VI	RDP	P16444	HxD		E		H	H		D	17,14
VII	URI	P0A8G3	HxH				H			D	19,52

Anexo 6

Esta tabla recoge todos los cristales homólogos a la región N-terminal de FluG. En cada cristal se especifica por un lado el nombre pdb, la función asignada, los ligandos presentes en el cristal, el organismo del que proviene y la referencia de la publicación. Por otro lado, se detalla la cobertura que tiene el cristal con la región N-terminal de FluG, el porcentaje de identidad que conserva esta región con la estructura de cristal y la conservación estructural reflejada como valor QMEAN. Aquellos enzimas cuya función no ha sido caracterizada, están representadas dentro de un **cuadrado rojo**. **Zn**: Zinc. **HDL**: Ácido D-arabinohidroxámico. **Co**: Cobalto. **13P**: 1,3-dihidroxiacetofosfato. **7QD**: (2S)-Ácido 2-hidroxi-4-oxobutan-1,2,4-tricarboxílico. **PDC**: Ácido piridin-2,6-dicarboxílico. **Mg**: Magnesio. **HJ7**: Ácido (2Z)-4-oxobut-2-en-1,2,4-tricarboxílico. **HVS**: (1Z,3E)-5-carboxi-3-metil-5-oxo-1-fenilpenta-1,3-dien-1-olato. **K**: Potasio. **Cl**: Cloro. **VNL**: 4-hidroxi-3-methoxibenzoato. **38L**: 2-nitrobenzen-1,3-diol. **1DF**: Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrobenzoico. **Ca**: Calcio. **Cd**: Cadmio. **TBP**: To be published.

Cristal	Función	Cobertura con FluG	Identidad de la secuencia	QMEAN	Ligandos	Organismo	Referencia
1J5S	Uronato isomerasa	5-408	14,68	-5,26	-	<i>Thermotoga maritima</i>	Schwarzenbacher R. et al 2003
3HK8	Uronato isomerasa	5-408	14,25	-6,93	Zn + HDL	<i>Bacillus halodurans</i>	Nguyen TT. Et al., 2009
4HK5	Uracil-5-carboxilato	185-410	18,85	-5,67	Zn	<i>Cordyceps militaris</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	Xu S. et al., 2013
4HJW	decarboxilasa		23,04	-5,73			
4IFR	2-amino-3-carboximuconato 6-semialdehido decarboxilasa	185-410	14,67	-6,11	Zn	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huo L. et al., 2013
4ERA	2-amino-3-carboximuconato 6-semialdehido decarboxilasa	185-410	13,59	-5,60	Co	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huo L. et al., 2012
2WM1	2-amino-3-carboximuconato 6-semialdehido decarboxilasa	185-409	12,90	-5,84	Zn + 13P	<i>Homo sapiens</i>	Garavaglia S. et al., 2009
6DXQ	4-oxalomesaconato hidratasa	185-409	16,84	-4,58	Zn + 7QD	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Hogancamp TN. Et al., 2018
4IH3	2-amino-3-carboximuconato 6-	185-410	12,37	-5,99	Zn + PDC	<i>Homo sapiens</i>	Huo L. et al., 2015

4ERI	semialdehido decarboxilasa 2-amino-3- carboximuconato 6- semialdehido decarboxilasa	185-410	13,59	-6,69	Zn + Mg	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huo L. et al., 2012
2HBV	semialdehido decarboxilasa 2-amino-3- carboximuconato 6- semialdehido decarboxilasa	185-410	14,13	-4,98	Zn + Mg	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Martynowski D. et al., 2006
6DXS	4-oxalomesaconato hidratasa 2-amino-3- carboximuconato 6- semialdehido decarboxilasa	185-409	15,79	-4,69	Zn + HJ7	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Hogancamp TN. Et al., 2018
4IGN	semialdehido decarboxilasa 2-amino-3- carboximuconato 6- semialdehido decarboxilasa	185-410	12,90	-5,86	Zn	<i>Homo sapiens</i>	Huo L. et al., 2015
6DWV	4-oxalomesaconato hidratasa	185-409	15,79	-5,09	Zn	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Hogancamp TN. Et al., 2018
6E6I	Hidrolasa de enlace meta del compuesto 2,2',3-trihidroxi-3'- metoxi-5,5'- dicarboxibifenil	185-410	16,49	-5,49	Zn + HVS	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Kuatsjah E. et al., 2018
5VN5	dicarboxibifenil	185-410	15,43	-5,94	Zn	<i>Sphingobium sp. SYK-6</i>	Kuatsjah E. et al., 2017
4IFK	2-amino-3- carboximuconato 6- semialdehido decarboxilasa	185-410	13,59	-5,60	Zn	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huo L. et al., 2013
4OFC	semialdehido decarboxilasa	185-410	14,13	-7,17	Zn	<i>Homo sapiens</i>	Huo L. et al., 2015
3DC8	Dihidropirimidinasas	236-409	16,56	-4,84	Zn	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Martinez- Rodriguez S. et al., 2010
2QPX	Amidohidrolasa metalodependiente TIM-barrel fold	4-406	29,32	-4,10	Zn	<i>Lactobacillus paracasei ATCC 334</i>	Joint Center for Structural Genomics (JCSG) TBP
2Q01	Uronato isomerasa	5-410	13,86	-5,94	K	<i>Caulobacter crescentus</i>	Patskovsky Y. et al. TBP
4I6V	Amidohidrolasa_2	5-410	15,36	-5,20	Zn	<i>Planctomyces limnophilus</i>	Fan Y. et al., TBP
3IAC	Glucuronato isomerasa	5-410	15,07	-5,96	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	Minasov G. et al., TBP
2QEE	Proteína BH0493	5-409	14,53	-6,68	Zn + Cl	<i>Bacillus halodurans</i>	Malashkevich V.N. et al., TBP
3IJ6	Hidrolasa metalodependiente	185-409	16,58	-5,86	Zn	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Patskovsky Y. et al. TBP
4L6D	5-carboxivanilato decarboxilasa	187-410	18,03	-6,52	VNL + Mn	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Fedorov AA. Et al., TBP
3IRS	Proteína BB4693	185-410	17,93	-3,66	-	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Patskovsky Y. et al. TBP
4QRO	γ -resorcilato decarboxilasa	187-410	19,67	-6,09	Mn + 38L	<i>Frompolaromonas sp.</i>	Patskovsky Y. et al. TBP
3CJP	Amidohidrolasa, Dihidroorotasa	184-409	19,66	-5,29	Zn	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Malashkevich VN. Et al TBP
2GWG	4-oxalomesaconato hidratasa	187-409	17,55	-5,50	Zn	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Forouhar F. et al., TBP

4QNR	5-carboxivanilato decarboxilasa	187-409	15,93	-6,23	Mn + 1DF	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Patskovsky Y. et al. TBP
4QS5			16,39	-6,29	1DF + Mn		
3NUR	Amidohidrolasa	185-409	15,14	-5,47	Ca	<i>Staphylococcus aureus</i>	Qiu W. et al., TBP
1J6O	Desoxirribonucleasa TatD	184-410	15,31	-6,26	-	<i>Thermotoga maritima</i>	Joint Center for Structural Genomics (JCSG) TBP
3E2V	Exonucleasa 3' -5' γ -resorcilato decarboxilasa	169-408	16,84	-6,81	Mg	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bonanno JB. Et al., TBP
2DTV	reversible	187-410	15,86	-5,36	Zn	<i>Rhizobium sp. MTP-10005</i>	Goto M. et al., TBP
2F6K	Amidohidrolasa metalodependiente	185-408	13,37	-6,75	Mn	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Das K. et al., TBP
4DZI	Amidohidrolasa metalodependiente TIM-barrel fold	185-408	13,11	-4,96	Cd	<i>Mycobacterium avium</i>	Patskovsky Y. et al. TBP

Anexo 7

En esta tabla se refleja la conservación de los residuos catalíticos importantes en cada enzima, en la región N-terminal de FluG. En los casos en los que un aminoácido puede efectuar más de una función en distintas enzimas, la función asignada está resaltada con el mismo color. Los aminoácidos subrayados en color amarillo, quedan fuera del modelo generado por Swiss-Model, y han sido determinados por alineamiento con el programa ClustalOmega (13.2. Análisis *in silico* de FluG). Los aminoácidos conservados, pero sin función en la proteína, están marcados en **verde**. **R'**: Arginina de la cadena adyacente.

Residuos									Función
1J5S	3HK8	4HJW	6DXQ	6E6I	4IFK	3DC8	2QPX	FluG	
H30	H26	H12	H8	H6	H9	H56	H17	H20	Unión M α
H32	H28	H14	H10	H8	H11	H58	H19	H22	Unión M α
-	H49	-	-	-	-	-	-	E39	Interacción sustrato
-	Y50	-	-	-	-	-	-	Q40	Interacción sustrato
-	-	-	-	-	R51	-	-	Q89	Interacción sustrato
-	R170	-	-	-	-	-	-	R136	Interacción sustrato
-	-	-	-	-	-	K147	K166	K192	Tras carbamilarse (Kcx), se une a ambos M α y M β
-	-	-	-	-	-	Y152	Y171	Y197	Interacción sustrato
H290	M258	H195	H178	H179	H177	H180	H227	H264	Unión M α /M β
-	-	-	-	Y190	-	-	-	-	Interacción sustrato
-	-	-	Y194	-	-	-	-	K276	Interacción sustrato
-	-	H251	H223	H223	H228	H236	H263	H298	Unión M β Interacción sustrato Interacción H2O
-	-	R262	-	-	-	-	-	A307	
-	-	-	R'234	R'234	R'239	-	-	-	Interacción sustrato
W366	-	-	-	-	-	-	-	E323	Unión M α
-	-	Y301	-	Y260	-	-	-	F325	Interacción sustrato
-	-	-	-	-	-	-	-	-	Unión M α Interacción sustrato
D397	D355	D323	E284	E282	D294	D313	D317	D354	Interacción sustrato Interacción H2O y sustrato Unión M α y H2O
-	R357	-	-	-	-	-	-	H356	Interacción sustrato
-	-	F326	-	-	-	-	-	F357	Interacción sustrato
-	-	-	-	V286	-	-	-	F357	Interacción sustrato
-	-	-	R289	-	-	-	-	-	Interacción sustrato
438	486	478	443	468	481	443	375	443	Nº de aminoácidos

Anexo 8

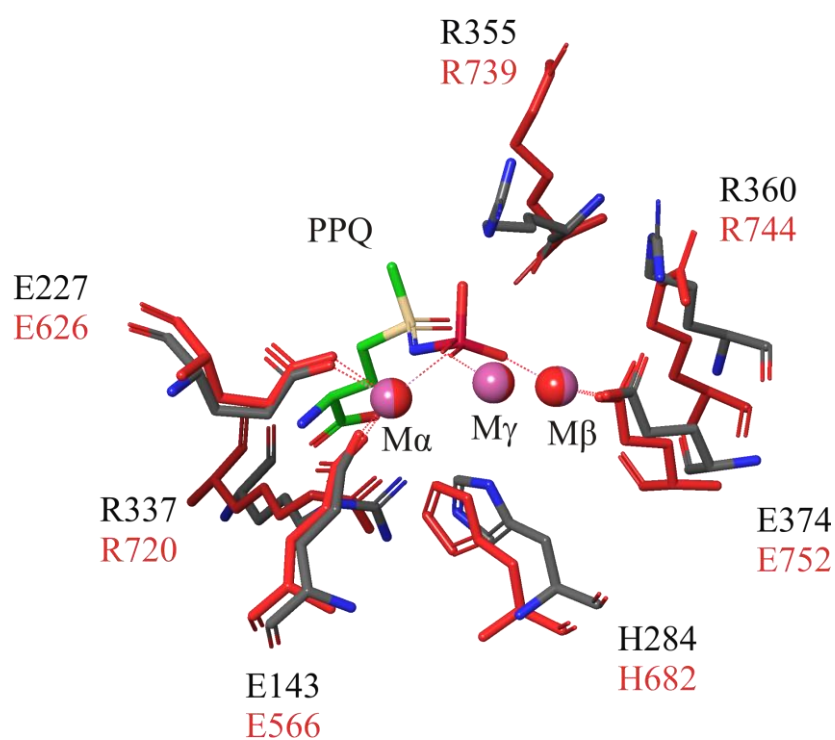
Esta tabla recoge todos los cristales homólogos a la región N-terminal de FluG. En cada cristal se especifica por un lado el nombre pdb, la función asignada, los ligandos presentes en el cristal, el organismo del que proviene y la referencia de la publicación. Por otro lado, se detalla la cobertura que tiene el cristal con la región N-terminal de FluG, el porcentaje de identidad que conserva esta región con la estructura de cristal y la conservación estructural reflejada como valor QMEAN. **Mg**: Magnesio. **Tl**: Talio. **Mn**: Manganeso. **Ca**: Calcio. **GLU**: Glutamato. **GLN**: Glutamina **ATP**: Adenosin trifosfato. **ADP**: Adenosin difosfato. **P3S**: L-metionin-S-sulfoximin fosfato. **1AZ**: 1-(3,4-diclorobenzil)-3,7-dimetil-8-morfolin-4-il-3,7-dihidro-1H-purin-2,6-diona. **CIT**: Ácido cítrico. **PPQ**: Fosfinotricina (Análogo estructural del glutamato, se utiliza para inhibir la actividad de las GS). **P3P**: Ácido (2A)-2-amino-4-[metil(fofonooxi)fosforil] butanoico. **2K9**: 9-fenil-4H-imidazo[1,2-a]indeno[1,2-e]pirazin-4-ona. **MAL**: Maltosa.

Cristal	Función	Cobertura con FluG	Identidad de la secuencia	QMEAN	Ligandos	Organismo	Referencia
2WHI	GS	429-863	23,80	-3,27	P3S + Mg + 1AZ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nilsson, M.T. et al 2009
1F1H	GS	431-863	20,05	-5,51	Tl + Mn + ADP	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gill HS. Et al., 2001
5ZLI	GS	429-863	24,26	-4,94	Ninguno	<i>Heliobacter pylori</i>	Joo HK et al., 2018
4LNI	GS	434-845	33,33	-5,05	P3S + Mg + ADP	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
1HTO	GS	429-863	23,80	-4,23	AMP + Mn + CIT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gill HS. Et al., 2002
5ZLP	GS	429-863	24,16	-4,29	Mg + PPQ + P3P + ADP + ATP	<i>Heliobacter pylori</i>	Joo HK et al., 2018
2GLS	GS	429-863	20,24	-7,80	Mn	<i>Salmonella typhimurium</i>	Yamashita MM et al. 1989
1FPY	GS	431-863	20,05	-4,32	PPQ + Mn + ADP	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gill HS. Et al., 2001

4XYC	GS	429-863	23,80	-3,99	2K9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Couturier C. et al., 2015
4LNF	GS	434-845	33,33	-4,63	Mg + GLN	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
2WGS	GS	429-863	23,80	-4,20	1AZ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nilsson, M.T. et al 2009
4LNN	GS	434-845	33,33	-5,45	Mg	<i>Bacillus subtilis</i>	Murray DS. Et al., 2013
4HPP	Probable GS	443-865	26,73	-3,93	Mg + Ca + GLU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ladner JE et al., 2012
2J9I	Proteína que contiene un dominio glutamato-amonio ligasa	431-865	22,05	-6,34	Ninguno	<i>Mus musculus</i>	Wyatt, K. et al., 2006
5LDF	GS	433-863	20,15	-4,54	MAL	<i>Escherichia coli</i>	Coscia F. et al., 2016

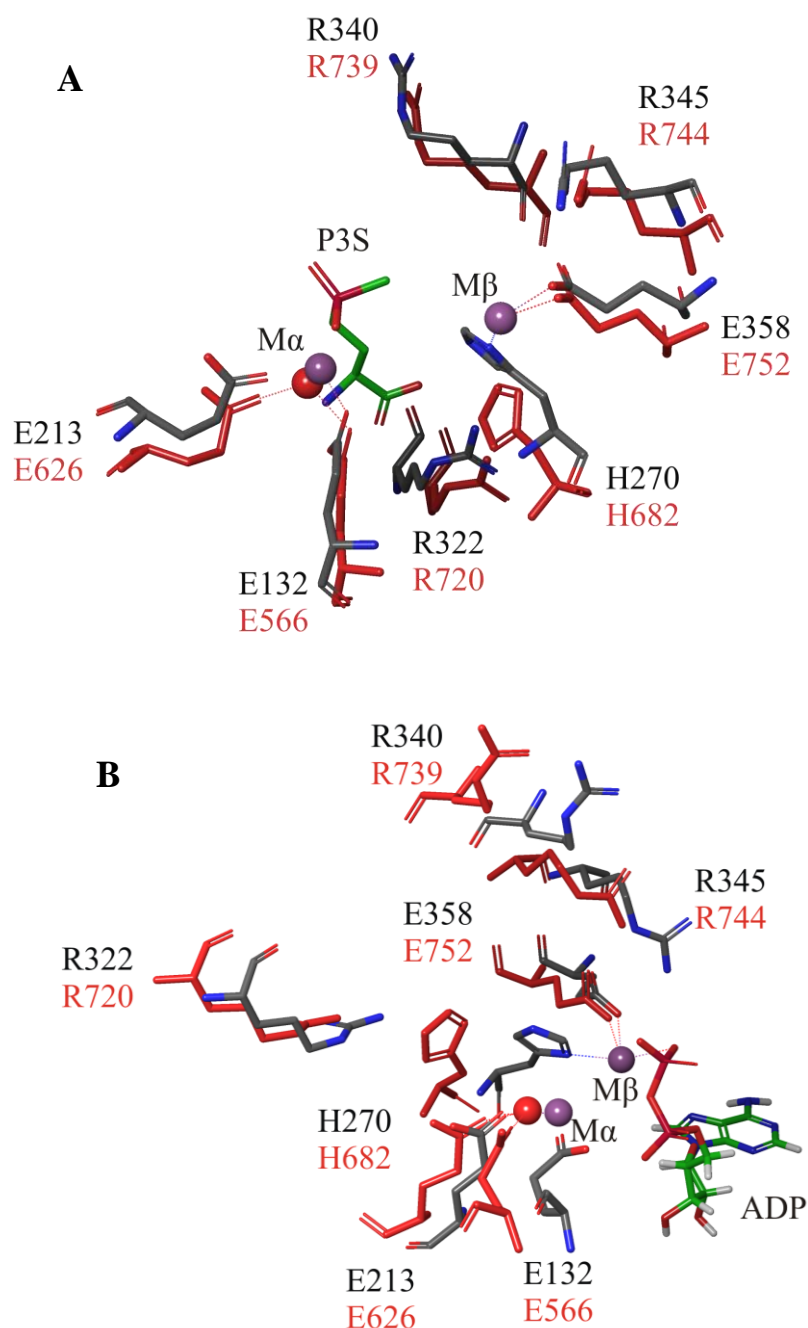
Anexo 9

Superposición estructural del modelo de FluG creado a partir de la estructura de cristal 2WHI. Los residuos de la plantilla están representados en **gris**, mientras que los del modelo de FluG, están representados en **rojo**. Sólo se muestran los residuos mutados en este trabajo. La coordinación entre ambos iones Mg^{2+} ($M\alpha$ interactúa con los residuos E566 y E626; $M\beta$ interactúa con H682 y E752) y los residuos en FluG muestran una similitud significativa con 2WHI. La molécula de PPQ, la cual inhibe la actividad de esta enzima, está coordinada a los tres iones ($M\alpha$, $M\beta$ y $M\gamma$) mediante el grupo fosfato.



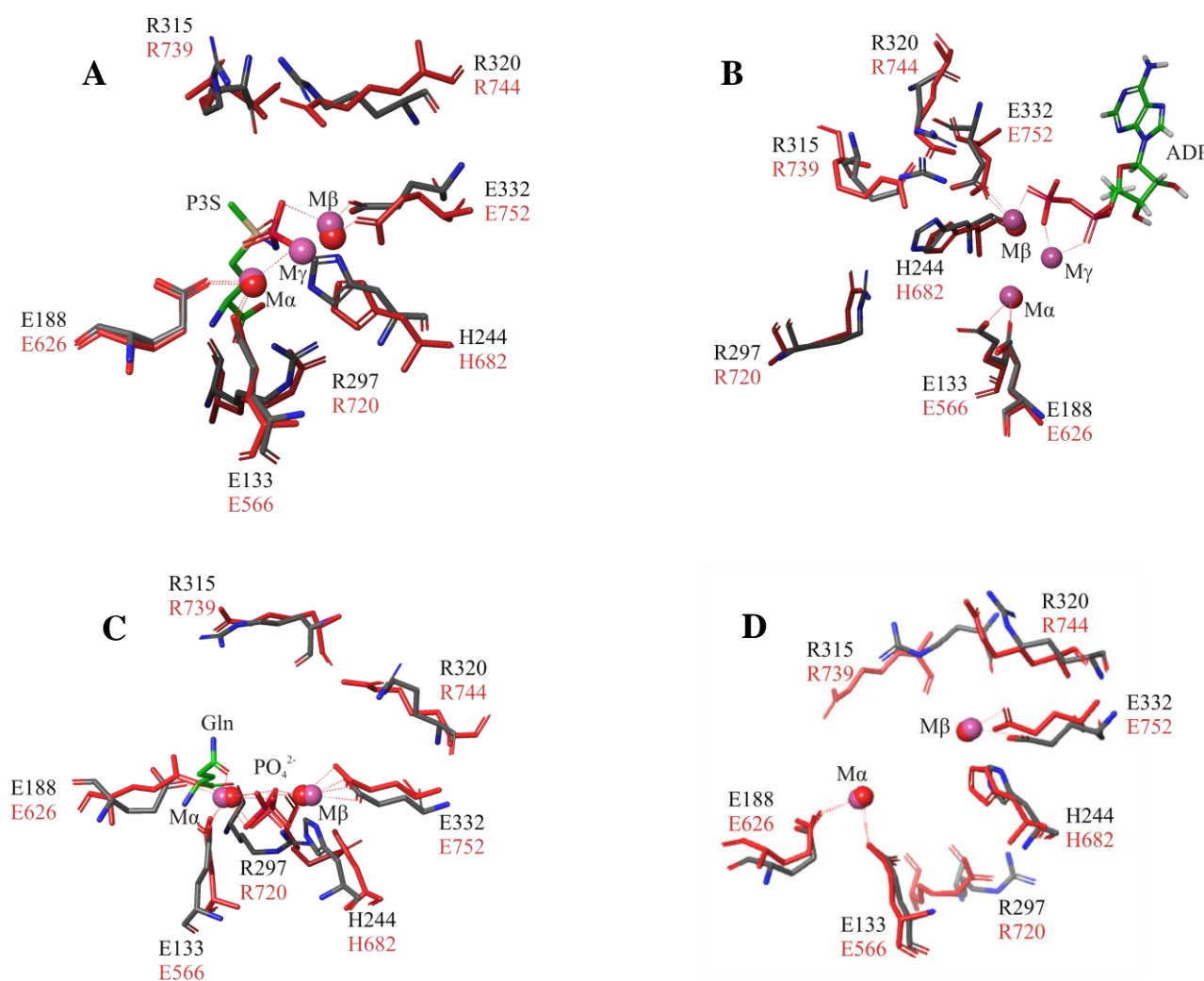
Anexo 10

Superposición estructural de los modelos de FluG creados a partir de la estructura de cristal 1FPY. Los residuos de la plantilla están representados en **gris**, mientras que los del modelo de FluG, están representados en **rojo**. Sólo se muestran los residuos mutados en este trabajo. **(A y B)** La coordinación entre ambos iones Mg^{2+} ($M\alpha$ interactúa con los residuos E566 y E626; $M\beta$ interactúa con H682 y E752) y los residuos en FluG muestran una similitud considerable con 1FPY. **(A)** La molécula de P3S, la cual inhibe la actividad de esta enzima, está coordinada al ion $M\alpha$ mediante el grupo fosfato. **(B)** La molécula de ADP, cuyo grupo fosfato es necesario para llevar a cabo la γ -glutamilación del glutamato, está coordinada al ion $M\beta$ mediante el grupo fosfato.



Anexo 11

Superposición estructural de los modelos creados a partir de las estructuras de cristal 4LNI (A, B), 4LNF (C) y 4LNN (D). Los residuos de los modelos originales están representados en **gris**, mientras que los del modelo de FluG, están representados en **rojo**. Sólo se muestran los residuos mutados en este trabajo. (A, B, C y D) La coordinación entre ambos iones Mg^{2+} ($M\alpha$ interactúa con los residuos E566 y E626; $M\beta$ interactúa con H682 y E752) y los residuos en FluG muestran una similitud significativa con 4LNI, 4LNF y 4LNN. (A) La molécula de P3S, la cual inhibe la actividad de esta enzima, está coordinada a los tres iones ($M\alpha$, $M\beta$ y $M\gamma$) mediante el grupo fosfato. (B) La molécula de ADP, cuyo grupo fosfato es necesario para llevar a cabo la γ -glutamilación del glutamato, está coordinada a los iones $M\beta$ y $M\gamma$ mediante los dos grupos fosfato. (C) La glutamina (Gln) (Producto de la enzima GS), está coordinada al ion $M\alpha$, mientras que el grupo fosfato (PO_4^{2-}), queda coordinado a ambos iones $M\alpha$ y $M\beta$, una vez finalizada la reacción.



Anexo 12

Tabla A. Se muestra el grado de similitud que conserva la región C-terminal de FluG con los seis genes parálogos (*pauA1-6*) y con el gen *pauA7*, obtenido mediante la matriz que da el porcentaje de la identidad obtenida a través de alineamientos.

	Matriz del porcentaje de la identidad del alineamiento (%)							Promedio (%)	
	FluG	PauA1	PauA2	PauA3	PauA4	PauA5	PauA6		PauA7
FluG (C-term)		21,67	22,3	23,39	22,14	20,63	22,91	24,75	22,54
PauA1 (PA0296)	21,67		34,82	42,7	96,51	31,3	43,27	25,9	42,31
PauA2 (PA0298)	22,3	34,82		35,19	34,38	43,1	34,02	23,02	32,44
PauA3 (PA1566)	23,39	42,7	35,19		41,81	31,71	75,55	26,38	39,53
PauA4 (PA2040)	22,14	96,51	34,38	41,81		31,3	42,38	25,9	42,06
PauA5 (PA3356)	20,63	31,3	43,1	31,71	31,3		32,93	25,06	30,86
PauA6 (PA5522)	22,91	43,27	34,3	75,55	42,38	32,93		26,14	39,64
PauA7 (PA5508)	24,75	25,9	23,02	26,38	25,9	25,06	26,14		25,31

Tabla B. Se muestra el porcentaje de identidad que presenta cada secuencia proteica de los genes *pauA1-6*, utilizando como molde la estructura de cristal 4HPP del gen *pauA7* (PA5508).

	FluG	PauA1	PauA2	PauA3	PauA4	PauA5	PauA6
Identidad con el modelo 4HPP (%)	26,73	25,06	23,27	25,80	25,31	26,49	25,80
QMEAN	-3,93	-3,82	-4,22	-4,57	-4,09	-3,94	-4,21

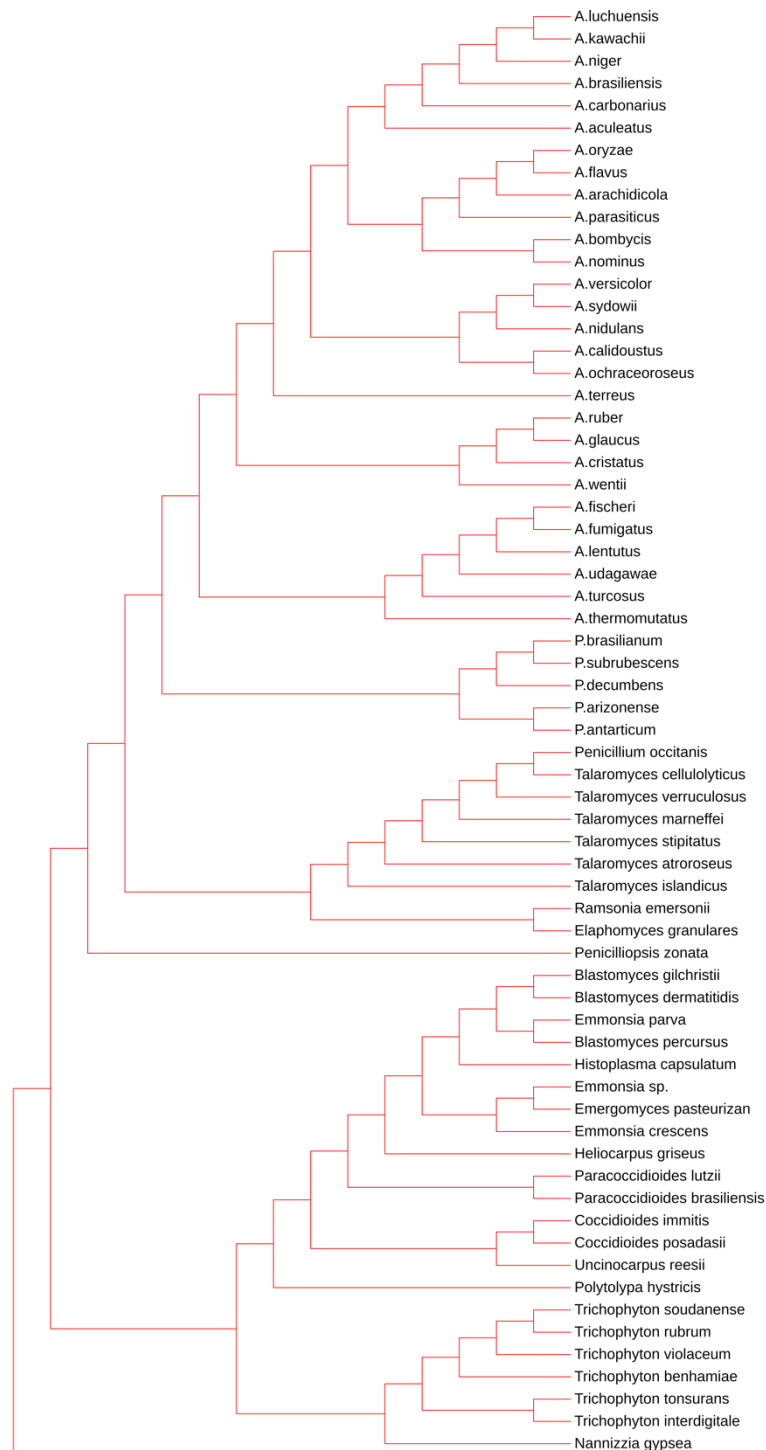
Anexo 13

Esta tabla muestra el porcentaje de identidad que conserva la proteína FluG de *Aspergillus nidulans*, con el resto de genes ortólogos a FluG en otros *Aspergilli* (no se incluyen todos por concisión).

Aspergillus species	Ensembl gene entry	Identity (%)
<i>Aspergillus calidoustus</i>	ASPCAL10313	78.50
<i>Aspergillus cristatus</i>	SI65_06388	68.55
<i>Aspergillus flavus</i>	AFLA_101920	69.94
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AFUA_3G07140	69.36
<i>Aspergillus lentulus</i>	ALT_2048	69.60
<i>Aspergillus luchuensis</i>	RIB2604_01900210	70.17
<i>Aspergillus niger</i>	An14g03390	70.29
<i>Aspergillus nomius</i> NRRL 13137	ANOM_010302	69.48
<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>	AOCH_000790	76.30
<i>Aspergillus oryzae</i>	AO090020000217	69.94
<i>Aspergillus parasiticus</i> SU-1	P875_00108952	70.29
<i>Aspergillus ruber</i> CBS 135680	EURHEDRAFT_530090	67.98
<i>Aspergillus terreus</i>	ATEG_01762	60.12
<i>Aspergillus udagawae</i>	AUD_4531	69.94

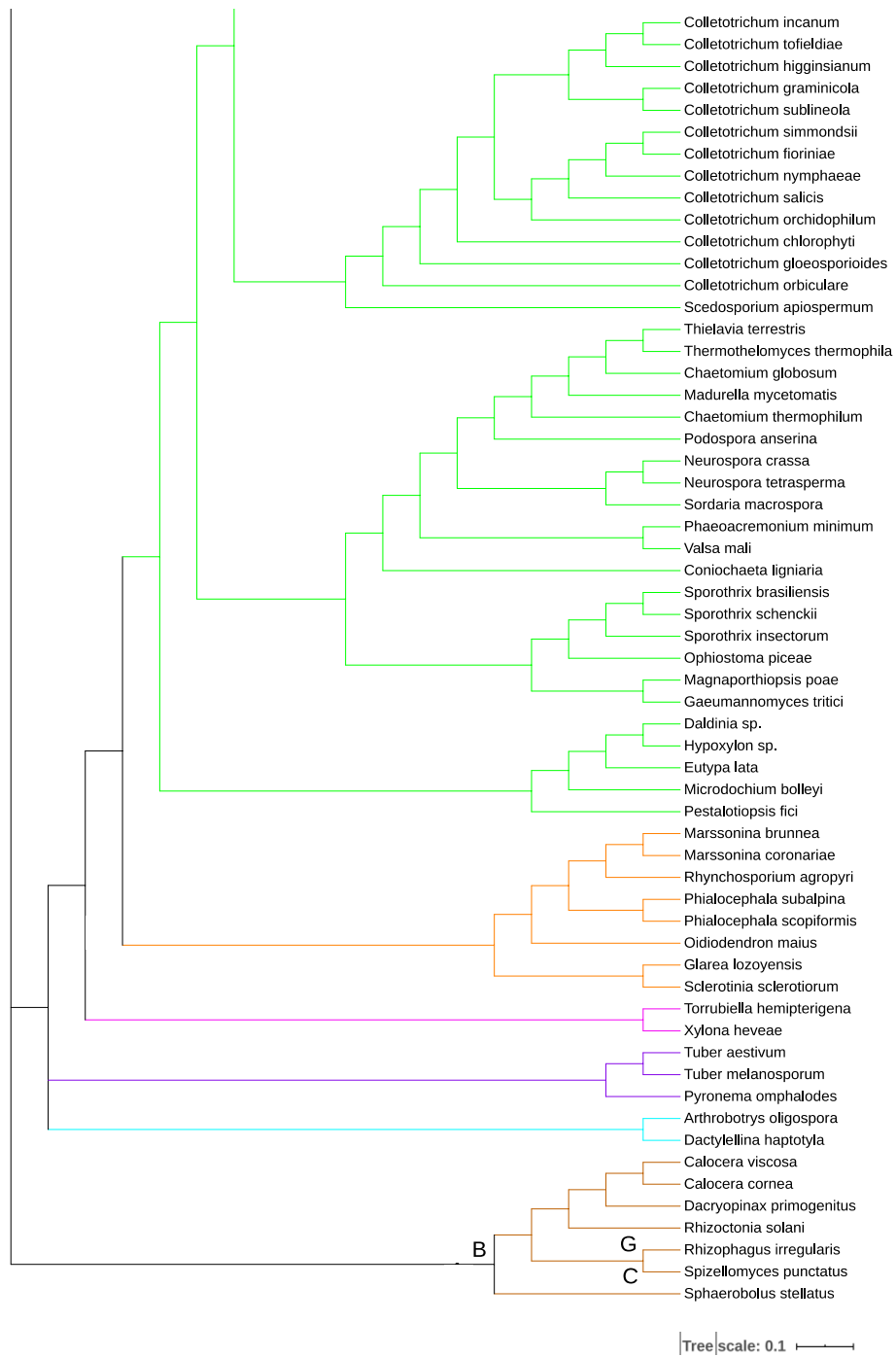
Anexo 14

Árbol filogenético de todos los homólogos de FluG encontrados en hongos. Los distintos grupos están representados mediante letras y números de la siguiente manera: (A) Ascomycota, (B) Basidiomycota, (C) Chytridiomycota, (G) Glomeromycetes, (Rojo) Eurotiomycetes, (Azul oscuro) Dothideomycetes, (Azul claro) Orbiliomycetes, (Rosa) Xylonomycetes, (Naranja) Leotiomycetes, (Verde) Sordariomycetes, (Morado) Pezizomycetes.





A



Anexo 15

Las tablas A y B tabla muestra los residuos catalíticos conservados en las regiones N- y C-terminal de FluG, respectivamente, en genes ortólogos a FluG de otros *Aspergilli*.

Tabla A	Residuos catalíticos de la región N-terminal						
A. nidulans	H20	H22	K192	Y197	H264	H298	D354
<i>A. calidouustus</i>	H20	H22	K192	Y197	H264	H298	D354
<i>A. cristatus</i>	H17	H19	K176	Y181	H244	H278	D334
<i>A. flavus</i>	H19	H21	K190	Y195	H265	H299	D355
<i>A. fumigatus</i>	H22	H24	K193	Y198	H266	H300	D356
<i>A. lentulus</i>	H22	H24	K193	Y198	H266	H300	D356
<i>A. luchuensis</i>	H20	H22	K191	Y196	H266	H300	D356
<i>A. niger</i>	H20	H22	K191	Y196	H266	H300	D356
<i>A. nomius</i> NRRL 13137	H19	H21	K190	Y195	H265	H299	D355
<i>A. ochraceoroseus</i>	H20	H22	K192	Y197	H264	H298	D354
<i>A. oryzae</i>	H19	H21	K190	Y195	H265	H299	D355
<i>A. parasiticus</i> SU-1	H19	H21	K190	Y195	H265	H299	D355
<i>A. ruber</i> CBS 135680	H17	H19	K175	Y180	H243	H277	D333
<i>A. terreus</i>	H19	H21	K189	Y194	H267	H301	D357
<i>A. udagawae</i>	H22	H24	K193	Y198	H266	H300	D356

Tabla B	Residuos catalíticos de la región C-terminal									
A. nidulans	E564	E566	E626	E633	H682	H684	R720	R739	R744	E752
<i>A. calidouustus</i>	E582	E684	E644	E651	H700	H702	R738	R757	R762	E770
<i>A. cristatus</i>	E542	E544	E603	E610	H659	H661	R697	R716	R721	E729
<i>A. flavus</i>	E563	E565	E624	E631	H680	H682	R718	R737	R742	E750
<i>A. fumigatus</i>	E559	E561	E621	E628	H677	H679	R715	R734	R739	E747
<i>A. lentulus</i>	E563	E565	E625	E632	H681	H683	R719	R738	R743	E751
<i>A. luchuensis</i>	E568	E570	E630	E637	H686	H688	R724	R743	R748	E756
<i>A. niger</i>	E569	E571	E631	E638	H687	H689	R725	R744	R749	E757
<i>A. nomius</i> NRRL 13137	E563	E565	E624	E631	H680	H682	R718	R737	R742	E750
<i>A. ochraceoroseus</i>	E566	E568	E628	E635	H684	H686	R722	R741	R746	E754
<i>A. oryzae</i>	E563	E565	E624	E631	H680	H682	R718	R737	R742	E750
<i>A. parasiticus</i> SU-1	E563	E565	E624	E631	H680	H682	R718	R737	R742	E750
<i>A. ruber</i> CBS 135680	E540	E542	E601	E608	H657	H659	R695	R714	R719	E727
<i>A. terreus</i>	E565	E567	E629	E636	H685	H687	R732	R751	R756	E764
<i>A. udagawae</i>	E563	E565	E625	E632	H681	H683	R719	R738	R743	E751

Anexo 16

En esta tabla se reflejan los valores de C/Área y DCM/Área junto con la desviación estándar (en paréntesis) de la producción de conidias (C) y el peso seco de la colonia (DCM) en medio mínimo (MMA) y medio completo (MCA).

	MMA		MCA	
	C/Área (millones/cm ²)	DCM/Área (mg/cm ²)	C/Área (millones/cm ²)	DCM/Área (mg/cm ²)
WT	4,1 (0,9)	22 (0,4)	21 (6)	4,8 (0,2)
<i>ΔfluG</i>	0,02 (0,01)	3,3 (0,5)	0,003 (0,003)	4,4 (0,2)
N-terminal	0,03 (0,02)	2,8 (0,4)	0,009 (0,008)	4,1 (0,4)
C-terminal	5 (1)	3,2 (0,3)	4 (1)	4,7 (0,6)
N+C separated	5 (1)	2,4 (0,4)	9 (3)	4,4 (0,6)
WT	5,0 (0,3)	2,4 (0,3)	19 (3)	4,9 (0,4)
<i>ΔfluG</i>	0,03 (0,02)	3,0 (0,4)	0,005 (0,004)	4,6 (0,4)
H20A-H22A	2,8 (0,6)	2,7 (0,2)	11 (1)	4,4 (0,7)
D354A	2,9 (0,3)	3,5 (0,5)	10,2 (0,7)	4,4 (0,4)
H20A-H22A- D354A	2,7 (0,1)	3,2 (0,3)	5,1 (0,7)	5,3 (0,7)
E566A	0,5 (0,3)	3,7 (0,4)	0,006 (0,007)	4,9 (0,7)
E626A	0,4 (0,3)	3,7 (0,5)	0,003 (0,003)	4,6 (0,6)
H682A	0,8 (0,3)	3,6 (0,9)	0,012 (0,008)	4,7 (0,2)
R720A	1,0 (0,6)	3,4 (0,4)	0,004 (0,004)	4,5 (0,3)
R739A	1,0 (0,3)	3,4 (0,5)	1,2 (0,8)	6 (1)
R744A	0,10 (0,07)	3,1 (0,3)	0 (0)	4,0 (0,3)
E752A	0,1 (0,1)	2,7 (0,4)	0,006 (0,008)	4,1 (0,5)
WT	4 (1)	2,7 (0,3)	22 (5)	4,7 (0,6)
<i>ΔfluG</i>	0,03 (0,02)	3,3 (0,1)	0,0061 (0,0003)	4,2 (0,4)
LSEI_0440+ C- term	13 (2)	2,1 (0,2)	23 (5)	3,5 (0,8)
N-term+ PA5508	6 (2)	2,5 (0,3)	24 (9)	4,6 (0,2)
LSEI_0440+ PA5508	5 (2)	2,6 (0,4)	19 (5)	4,8 (0,2)
PA5508	5 (1)	2,3 (0,2)	11 (4)	4,7 (0,3)

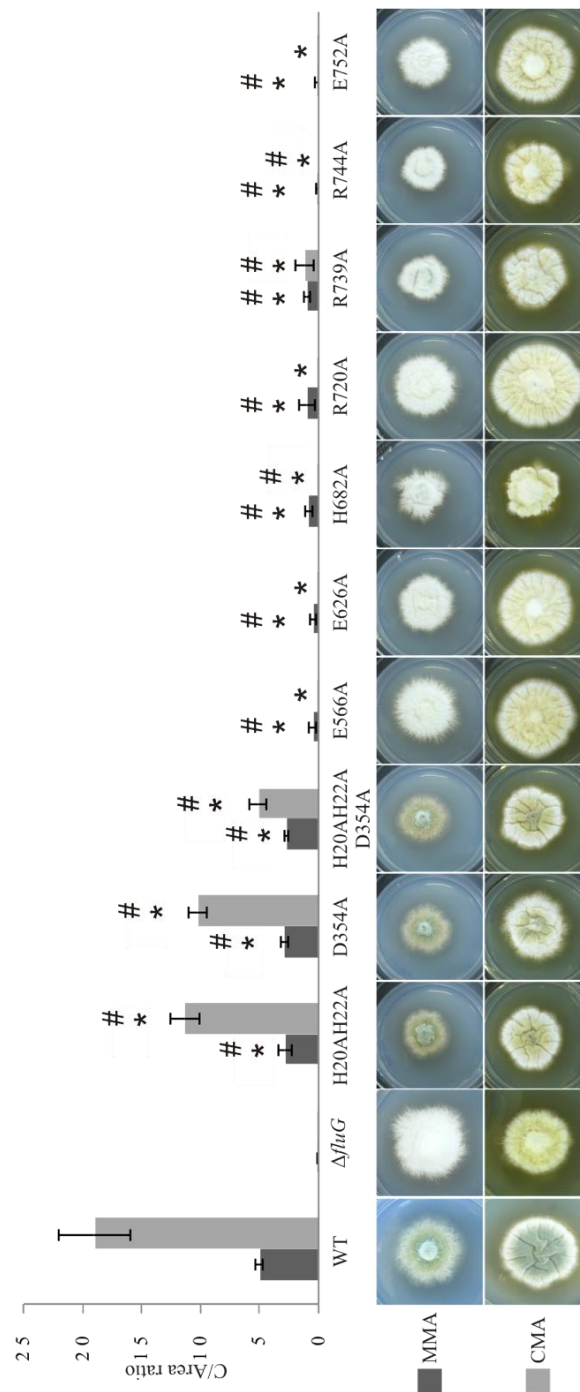
Anexo 17

En esta tabla se reflejan los valores del conteo de cleistotecios en una cepa silvestre (WT), un mutante nulo de *fluG* ($\Delta fluG$) N-terminal y C-terminal de FluG, junto con la desviación estándar (en paréntesis) en medio mínimo (MMA) y medio completo (MCA).

	MMA	MCA
WT	709 (31)	812 (71)
$\Delta fluG$	443 (22)	0 (0)
N-terminal	461 (20)	0 (0)
C-terminal	451 (28)	726 (37)

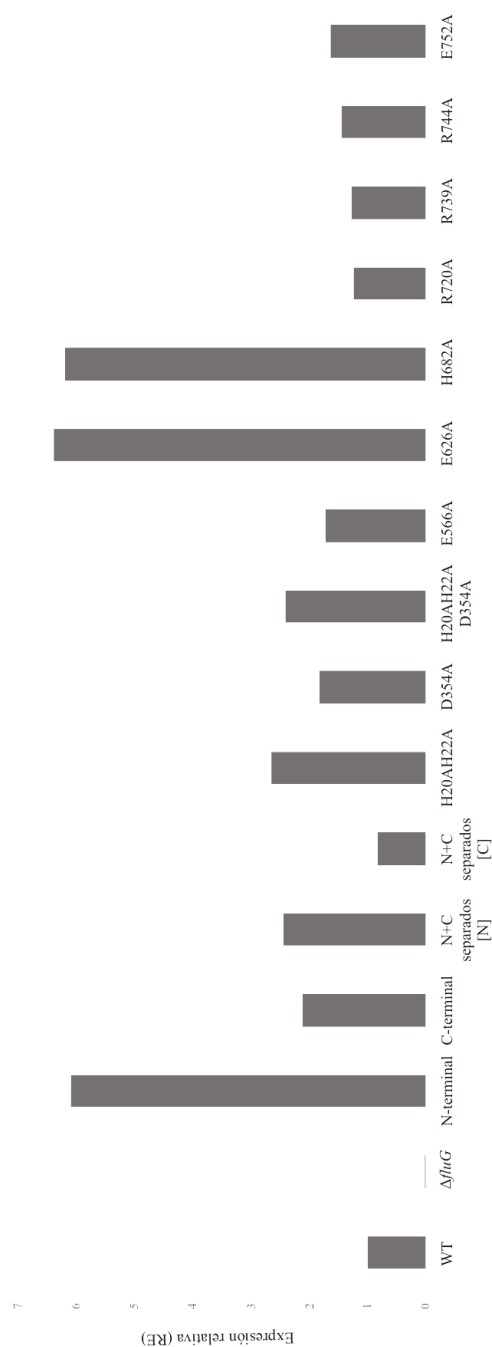
Anexo 18

Fenotipos y ratios de C/Área (millones/cm²) de todos los mutantes FluG. Cepa silvestre (WT) junto con el nulo de *fluG* ($\Delta fluG$) y los mutantes puntuales de ambas regiones en MMA y MCA. Los valores C que son estadísticamente diferentes (valor P < 0.05) al WT (*) y el $\Delta fluG$ (#) están marcados. Los valores de C/Área en medio mínimo (MMA) están representados en gris oscuro, y los valores de C/Área en medio. Completo (MCA) están representados en gris claro. Barra de escala = 1 cm



Anexo 19

Los valores de expresión de *fluG* para cada cepa en MMA se muestran en el gráfico. Todas las muestras fueron tomadas después de 18 horas de crecimiento vegetativo. Las siglas se refieren a lo siguiente: WT, cepa silvestre; $\Delta fluG$, *fluG* mutante nulo; N-terminal, región (1-406); C-terminal, región (427-865); N + C separados [N] y N + C separados [C], mutante de región separada N- y C-terminal; H20A-H22A / D354A / H20A-H22A-D354A, mutantes puntuales de la región N-terminal; E566A / E626A / H682A / R720A / R739A / R744A / E752A, mutantes puntuales de la región C-terminal.



Anexo 20

Tabla A. Homología de la correa helicoidal del extremo C-terminal de FluG, con la GSI (1FPY) y la GGL (4HPP), en la que se muestran los valores QMEAN de cada residuo.

Similitud estructural de los residuos que componen la correa helicoidal														Promedio
FluG	D	E	K	A	R	R	K	W	L	V	E	R	Y	
1FPY	0,70	0,64	0,63	0,65	0,65	0,65	0,63	0,65	0,63	0,63	0,60	-	-	0,64
4HPP	0,70	0,72	0,75	0,73	0,71	0,71	0,73	0,68	0,71	0,73	0,66	0,69	0,71	0,71

Tabla B. Análisis de la presencia o ausencia de los residuos en la región de las dos láminas beta en los modelos de 4HPP y FluG, en comparación con la GSI (1FPY). En **rojo** están representados el número de gaps (huecos) que la herramienta Swiss-Model ha asignado a la hora de alinear la secuencia de PauA7 y FluG con el cristal 1FPY.

	Región de interés									Total huecos
	1FPY: Dos laminas beta / 4HPP: Sin estructura									
1FPY	D136	3aa	R139	33 aa	P173	1aa	V175	1 aa	G177	33 gaps
PauA7	G138	2aa	G141	33 gaps	E142	1aa	P144	1 gaps	A145	
1FPY	D136	6aa	S143	2 aa	G146	11 aa	W158 N159	10 aa	G170	23 gaps
FluG	K571	6aa	T578	2 gaps	G579	11 gaps	E580 E581	10 gaps	D582	
PauA7	G138	3aa	E142	10 gaps	R143 P144	1 gaps	A145			11 gaps
FluG	K571	3aa	D575	10 aa	S586 V587	1 aa	N589			

Anexo 21: Artículo científico



The Early Asexual Development Regulator *fluG* Codes for a Putative Bifunctional Enzyme

Mikel Iradi-Serrano, Leire Tola-García, Marc S. Cortese and Unai Ugalde*

Microbial Biochemistry Laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country, San Sebastian, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Gustavo Henrique Goldman,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Kap-Hoon Han,
Woosuk University, South Korea
István Pócsi,
University of Debrecen, Hungary

*Correspondence:

Unai Ugalde
unaiona.ugalde@ehu.eus

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 December 2018

Accepted: 27 March 2019

Published: 17 April 2019

Citation:

Iradi-Serrano M, Tola-García L,
Cortese MS and Ugalde U (2019) The
Early Asexual Development Regulator
fluG Codes for a Putative Bifunctional
Enzyme. *Front. Microbiol.* 10:778.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00778

FluG is a long recognized early regulator of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *fluG* null mutants show profuse aerial growth and no conidial production. Initial studies reported sequence homology of FluG with a prokaryotic type I glutamine synthetase, but catalytic activity has not been demonstrated. In this study, we conducted an in-depth analysis of the FluG sequence, which revealed a single polypeptide containing a putative N-terminal amidohydrolase region linked to a putative C-terminal γ -glutamyl ligase region. Each region corresponded, separately and completely, to respective single function bacterial enzymes. Separate expression of these regions confirmed that the C-terminal region was essential for asexual development. The N-terminal region alone did not support conidial development, but contributed to increased conidial production under high nutrient availability. Point mutations directed at respective key catalytic residues in each region demonstrated that they were essential for biological function. Moreover, the substitution of the N- and C-terminal regions with homologs from *Lactobacillus paracasei* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively, maintained functionality, albeit with altered characteristics. Taken together, the results lead us to conclude that FluG is a bifunctional enzyme that participates in an as yet unidentified metabolic or signaling pathway involving a γ -glutamylated intermediate that contributes to developmental fate.

Keywords: FluG, *Aspergillus nidulans*, enzyme, development, amidohydrolase, γ -glutamyl ligase

INTRODUCTION

Surface cultures of the model ascomycete *Aspergillus nidulans*, present a complex developmental pattern which combines vegetative hyphae with asexual (Adams et al., 1998) and sexual structures (Dyer and O’Gorman, 2012). This pattern is modulated in response to environmental factors, such as the composition of the substrate, exposure to the gas phase and light.

The genetic regulation that governs the primal transition from vegetative hyphae to asexual development has been examined in considerable detail. A set of genes, which are expressed in vegetative hyphae, are required to initiate the morphogenetic process. They are collectively known as Upstream Developmental Activators (UDAs). These, in turn, activate a second set of the genes, known as the Central Developmental Pathway (CDP), which are only expressed in conidia-bearing structures (Yu et al., 2006).

One of the earliest acting UDA factors is *fluG* (AN4819). Its deletion results in colonies which fail to produce conidiophores and accumulate aerial vegetative hyphae resulting in a raised mycelial morphology, commonly known as *fluffy* (Lee and Adams, 1994). In addition, Δ *fluG* mutants show defects in autolysis (Emri et al., 2005) and secretion (Wang et al., 2015).

A remarkable feature of FluG signaling involves its extracellular transmission. A wild type colony can induce the sporulation of an adjacent *fluG* null mutant separated by a membrane (Lee and Adams, 1994). The search for the signal conducted by Rodríguez-Urra et al. (2012) identified an adduct of two excreted secondary metabolites [diornicol and dehydroaustinol (DHO)] that was capable of inducing a partial sporulation response when added onto a *fluG* null mutant colony. Interestingly, Márquez-Fernández et al. (2007) had earlier discovered that the deletion of a phosphopantetheinyl transferase (PPTase) *cfwA/npqA*, an enzyme that acting upstream of DHO biosynthesis, exhibited a phenotype with severely reduced growth and asexual development. Rodríguez-Urra et al. (2012) pointed out, however, that an earlier report by Nielsen et al. (2011) described the phenotype of a null mutant of the gene coding for the synthesis of the austinol (*ausA*, AN8383), the precursor in the DHO biosynthesis, as conidial. Hence, a clarification on the connection between FluG signaling and DHO-induced conidiation is pending.

Early studies on the FluG protein showed that it is expressed in the cytosol throughout all stages of development, and that the C-terminal region (aa387 to aa865) is necessary for induction of conidiophore development. Interestingly, this region showed sequence similarity with prokaryotic type I glutamine synthetase (GSI) (Lee and Adams, 1994; D'Souza et al., 2001). Later investigations showed, however, that this region did not display GS activity (Margelis et al., 2001). Other reports indicated that it resembles gene SCO6962 from *Streptomyces coelicolor* (Rexer et al., 2006) which has been attributed to be a γ -glutamyl ligase (GGL) (Krysenko et al., 2017). The N-terminal region has no attributed functional role, but has been reported to bear similarity with an amidohydrolase (SCO6961) from *Streptomyces coelicolor* (Rexer et al., 2006).

Although *fluG*-like sequences (containing a N-terminal amidohydrolase and a GSI) have been reported in the *Aspergilli* (Mah and Yu, 2006; Ogawa et al., 2010; Chang et al., 2012; Wang et al., 2015), they are also present in genomes of diverse fungal genera (Schumacher et al., 2015; Li et al., 2017), bacteria (Strong et al., 2003; Rexer et al., 2006) and higher plants, where the proteins have attributed roles in nodulation and biotic stress signaling (Mathis et al., 1999, 2000; Trevaskis et al., 2002; Doskočilová et al., 2011; Silva et al., 2015).

In this investigation, we confirm that an *ausA* null mutant has a conidiating phenotype, thus showing that FluG-related signaling is not directly connected to DHO-induced conidiation. In addition, an updated structural analysis of the FluG protein revealed that the N-terminal region presented structural similarity to a prokaryotic amidohydrolase from *Lactobacillus paracasei*, and the C-terminal region presented structural similarity to a γ -glutamyl aromatic monoamine ligase from *Pseudomonas aeruginosa*. Alanine substitutions of the

predicted key catalytic residues in each region yielded loss of function phenotypes which were comparable to those of the respective null mutants. Finally, the replacement of both N- and C-terminal regions by their respective homologs, yielded functional phenotypes. Our findings situate FluG as a putative bifunctional enzyme that may regulate the balance between vegetative growth and asexual development through the levels of a γ -glutamylated metabolite.

MATERIALS AND METHODS

Fungal Strains and Culture Conditions

The strains used are shown in **Supplementary Table 1**. Wild type (*veA+*) strains were used for FluG mutagenesis and phenotypic analysis. For the analysis of phenotypic complementation experiments, and *ausA*-related assays, *veA1* strains were used, in order to establish comparisons with previously published experiments (Lee and Adams, 1994; Yager et al., 1998; D'Souza et al., 2001; Nielsen et al., 2011). Strains were cultured as previously described by Pontecorvo et al. (1953) in *Aspergillus* minimal medium (MMA), using trace elements as described by Käfer (1965), or complete medium (CMA; MMA + 5 g/L yeast extract) with a pH 6.8. Ammonium tartrate (5 mM) and D-glucose (2% w/v) were added as nitrogen and carbon sources, respectively, in solid or liquid form with the appropriate supplements. All cultures were incubated at 37°C in white light (Sera DayLight Brilliant T8 15 W/m²; light source at 30 cm from the cultures). Phenotypic complementation experiments were carried out in CMA medium, incubating for a further 72 h after the strains contacted each other (Lee and Adams, 1994). In fluorescence microscopy experiments, strains were grown in adequately supplemented MMA containing 0.1% D-glucose, 5 mM ammonium tartrate and 25 mM monobasic sodium phosphate, similar to watch minimal medium (WMM) (Peñalva, 2005).

Generation of Mutant, Tagged, and Overexpression Strains

The oligonucleotides used are listed in **Supplementary Table 2**. Genomic cassettes were amplified through the fusion-PCR technique (Yang et al., 2004; Korbie and Mattick, 2008). The *A. nidulans* transformation technique used was an adaptation of the protoplast generation procedure described by Szewczyk et al. (2006), followed by the transformation protocol described by Tilburn et al. (1983). The strains coding for separate regions of FluG, point mutants of both regions and homologous regions of *Lactobacillus paracasei* and *Pseudomonas aeruginosa* genes were generated by transforming protoplasts of a Δ *fluG* strain with the genomic cassettes bearing the desired modifications plus the 5'- and 3'-UTR regions. The selection of transformants was done using 5-fluoroorotic acid monohydrate (5-FOA; 2 mg/mL; Apollo Scientific, Stockport, United Kingdom).

N- and C-terminally GFP-tagged *fluG* strains were obtained using the method for GFP-tagging described by Yang et al. (2004). The strain carrying the inducible *alcA* expression promoter of the N-terminally GFP-tagged *fluG* was constructed

using plasmid pNT5 (Takeshita et al., 2008). *alcA(p)::GFP::fluG* expressing plasmid was obtained by cloning *fluG* (PCR amplified with oligonucleotides AscI_{fluG}(-ATG)-F and BamHI_{fluG}-R, 1 kb on the N-terminal sequence of *fluG* with no starting ATG sequence; see **Supplementary Table 2**) into the AscI and BamHI sites of pNT5, yielding to pMI2. The plasmid was then transformed into the wild type (BD824) strain. For localization studies, strains coexpressing the GFP-tagged *fluG* under native or inducible promoter and the histone H1 (*hhoA*) fused C-terminally to mRFP (mRFP; red fluorescent protein) and mCherry (mCh; cherry red) as nuclear markers, respectively, were constructed (Markina-Iñárraegui et al., 2011).

The homologous recombination of the constructs was confirmed by Southern blots. This experiment, using 5'- and 3'-UTR regions as probes, was done as described previously (Garzia et al., 2009). All the mutant strains were sequenced to prove there were no undesired mutations.

Spore and Dry Cell Mass Measurements

The procedure of obtaining spore and dry cell mass (DCM) ratios was as follows: conidia counts (millions/cm²) were obtained after culturing strains in MMA and CMA at 37°C for 72 h. Colony areas were measured using Digimizer Version 4.6.1 (MedCalc Software bvba). Spores were collected by excising the entire colony, soaking the agar in Tween 0.02% (diluted from Tween 20), vortexing twice for 1 min and quantified using a hemocytometer. DCM (mg/cm²) from each strain was obtained by growing colonies on a Spectra/Por® 6 Dialysis Membrane with a 3.5 kDa molecular weight cut off (Spectrum Laboratories) and culturing at 37°C for 72 h. The mycelium was then removed from the membrane and dried at 80°C overnight.

The values obtained with the WT and the Δ *fluG* strains were used as references to analyze mutant strains.

Statistical Analysis of the Results

Quantitative results were obtained as the mean with standard deviation of at least three independent counts, each consisting of three or four biological replicates per strain and condition. The results were subjected to the Grubbs' test (Grubbs, 1969) using the R software version 3.4.1 (R Core Team, 2008) in order to detect and discard outliers with a confidence level of 95%. A PERMANOVA pair-wise test using an Euclidean distance measurement (P -value < 0.05) was performed on the remaining results to justify the significance of differences between strains using PRIMER-E software v6 (Clarke and Gorley, 2006).

Bioinformatics

The *fluG* DNA sequence (AN4819.2) was retrieved from Ensembl Fungi (Kersey et al., 2018) and homologs in the Aspergilli were identified by Fungal Compara (in Ensembl Fungi). Multiple sequence alignments were performed using the Clustal Omega application provided by EBI (Li et al., 2015). Alignments visualization and analysis were performed with Jalview version 2.10.3b1 (Waterhouse et al., 2009) or GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas et al., 1997). FluG protein residue conservation scores among all FluG homologs in the Aspergilli were obtained using the Jensen-Shannon divergence (Capra and Singh, 2007).

Identity among all FluG proteins was obtained as an average value of all FluG sequence identities in the Aspergilli compared with the *Aspergillus nidulans* FluG.

Bioinformatic investigations of the FluG sequence were made using the following predictors: SignalIP 4.1 (Nielsen, 2017) for signal-peptide prediction; NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009) and NetNES 1.1 (la Cour et al., 2004) for nuclear localization and export signals prediction, respectively; TMHMM server v2 (Sonnhammer et al., 1998) for prediction of transmembrane helices in protein; epestfind (Rechsteiner and Rogers, 1996) to find PEST motifs as potential proteolytic cleavage sites.

Crystal structure templates for each region were identified using SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014), and those with high QMEAN values were further analyzed (Benkert et al., 2009). The highest scoring structures in terms of sequence identity and coverage were used as templates for FluG structural modeling. Protein structures were obtained from the Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2002). Prior to modeling, the X-ray data was preprocessed and curated (e.g., removal of water, addition of explicit hydrogens) using the Protein Preparation Wizard from the Schrödinger Suite, version 2017-1 (Sastry et al., 2013). Missing side chains were generated using Prime (Jacobson et al., 2004) while the protonation states of each side chain were generated using EPIK at pH = 7 (Shelley et al., 2007). Protein minimization was performed using the OPLS3 force field (Shivakumar et al., 2010; Harder et al., 2016). Homology models were built using program Prime based on the curated reference crystal structure and applying the SWISS-MODEL alignment for each region. The structural and spatial distribution consistency of the FluG site-directed mutant models was validated overlapping these models against the wild type FluG model, using Quick Align and Superimpose tools.

RNA Isolation

RNA was isolated from the mycelium of strains cultivated in a flask for 18 h at 37°C. Mycelia was collected by filtration through Miracloth (Calbiochem®), squeezed to dry and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) and RNA concentration and purity were calculated using a NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, United States). All samples were verified by electrophoresis using a 1.2% (w/v) agarose gel.

Quantitative RT-PCR

The oligonucleotides employed for quantitative RT-PCR (qPCR) experiments are detailed in **Supplementary Table 2**. Briefly, cDNA from each investigated sample was synthesized using PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio USA Inc.) from 500 ng of total RNA, following manufacturer's instructions. The final 20 μ L PCR reaction included 1.5 μ L of 1:2 diluted cDNA as template, 4 μ L of 5x PyroTaq EvaGreen® qPCR Mix Plus with ROX (Cultek Molecular Bioline, Madrid, Spain), and transcript-specific forward and reverse oligonucleotides at a 0.5 μ M final concentration. Real time PCR was carried out in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) according to the manufacturer's directions. The reaction consisted of 15 min at

95°C of initial denaturation, and 40 cycles of DNA amplification (15 s at 95°C of denaturation, 15 s at 60°C of annealing and 30 s at 72°C of elongation). After each PCR, we performed a melting curve analysis to confirm the specific amplification of a single DNA segments and the absence of non-specific amplified DNA.

The fluorescent signal obtained for each gene was normalized to that obtained with the β -tubulin gene (*benA*) to correct for sampling errors.

Protein Isolation and Western Blot

Protein extraction from lyophilized samples was performed by the alkaline-lysis extraction, using lysis buffer (0.2 M NaOH, 0.2% β -mercaptoethanol), as described by Hervás-Aguilar and Peñalva (2010).

Tagged protein expression was analyzed by Western blotting. Proteins were resolved in 8% SDS-polyacrylamide gels and electrotransferred to Immobilon-P[®] PVDF membranes by Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (Bio-Rad). Once transference was completed, Ponceau staining was used as validation for loading control. GFP-FluG was detected using mouse anti-GFP (1/5,000; Roche). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG immunoglobulin (1/4,000; Jackson ImmunoResearch Lab) cocktail was used as secondary antibody. Peroxidase activity was detected using Clarity[™] Western ECL Substrate (Bio-Rad). Chemiluminescence was observed using a ChemiDoc[™] XRS+ System (Bio-Rad) and signal intensity was measured with Image Lab[™] version 5.2 software (Bio-Rad).

Fluorescence Microscopy

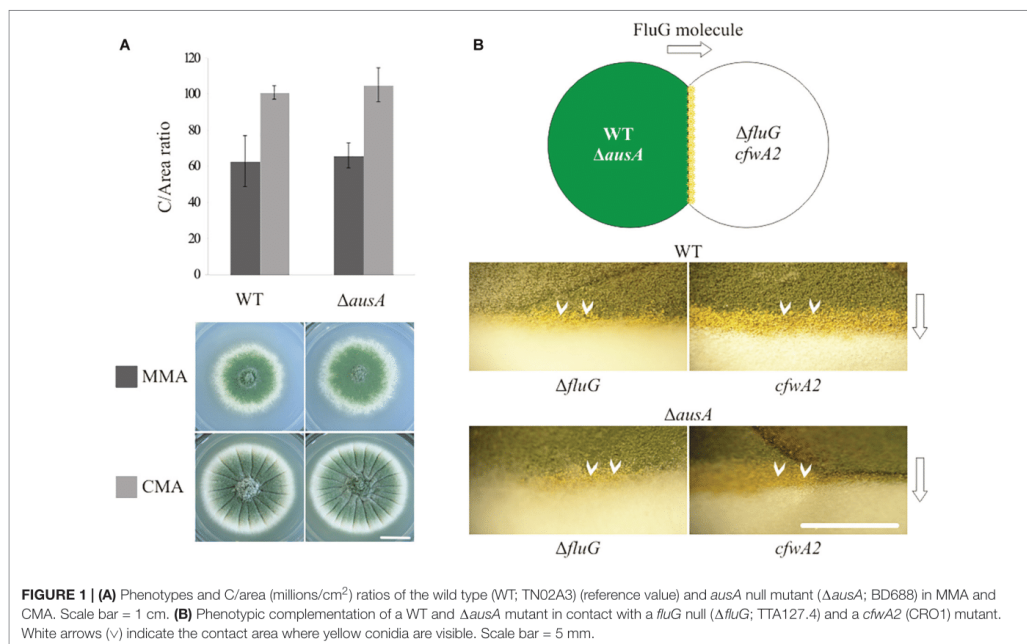
Conidia of strain BD1181 were cultured in uncoated glass-bottom dishes (Ibidi[®] GmbH, Germany; 2.5 mL of medium per well) for 16 h at 25°C (Peñalva, 2005). After this period, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 100 mM L-threonine (Sigma) in place of D-glucose to induce *alcA(p)::GFP::fluG* expression.

Fluorescence images were acquired using a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscope equipped with a 63x Plan Apochromat 1.4 oil immersion Lens, AxioCam MRm Rev.3 camera, a Zeiss HXP 120C external light source for epifluorescence excitation and fitted with filter set 38HE for green fluorescence (Ex BP 470/40; FT 495; Em BP 525/50) and filter set 43HE for red fluorescence (Ex BP 545/25; FT 570; Em BP 605/70). Numerous samples were observed before taking representative images. Fluorescence levels were measured using Fiji software (Schindelin et al., 2012).

RESULTS

DHO-Induced Asexual Development Is Independent of the FluG (UDA) Pathway

In order to verify previous results by observation that an *ausA* null mutant strain is unaffected in asexual development (Nielsen et al., 2011), an Δ *ausA* (*veA1*; BD688) strain was generated and phenotypically characterized in comparison to a parent wild type (WT; *veA1*; TN02A3) strain, as shown in **Figure 1A**. The values



for C and DCM for each strain are provided in **Supplementary Table 4**. In MMA and CMA, the *C*-values recorded for both WT and Δ ausA mutant strains were statistically similar. These results indicated that asexual development was not significantly affected in the Δ ausA mutant.

In addition, a phenotypic complementation experiment confirmed that both WT (*veA1*) and Δ ausA (*veA1*) strains were able to efficiently complement the sporulation defects of a Δ fluG (*veA1*; TTA127.4) and *cfwA2* (*veA1*; CRO1) mutant, as can be observed in **Figure 1B**. Thus, regardless of the induction effect caused by DHO on asexual development, it cannot be attributed as part of the FluG-dependent UDA pathway. This led to the conclusion that an in-depth study of the FluG protein was required to gain insight on its function.

The FluG Sequence Codes for a Putative Bifunctional Enzyme

A protein BLAST of FluG homologs revealed that they were present in all 14 sequenced species of the Aspergilli (**Figure 2**), with a considerable degree of identity ($70 \pm 4\%$) (**Supplementary Table 3**). Earlier sequence analyses referred to in the introduction (Lee and Adams, 1994; Mathis et al., 1999) had indicated that the *fluG* sequence contained two regions which coded for two putative prokaryotic enzymes. We therefore proceeded to undertake a protein sequence and structure analysis using current applications and databases. A search of available crystal structures using the sequence of the FluG protein showed that the N-terminal region bears similarity with a range of amidohydrolases. The highest sequence coverage and structural homology score was obtained with a putative metal-dependent hydrolase of the TIM-barrel fold (pdb entry 2QPX, coded by gene LSEI_0440) present in *Lactobacillus paracasei* ATCC 334. The 2QPX crystal structure corresponded to the 4–406 amino acid region of FluG, with an identity of 25% and a similarity of 45%. Conjointly, the C-terminal region exhibited the highest scores with a GSI (pdb entry 4LNN, coded by gene *glnA*) from *Bacillus subtilis* (strain 168) (Murray et al., 2013) and a GGL (pdb entry 4HPP, coded by gene PA5508) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Ladner et al., 2012). The 4LNN crystal structure coincided with the 429–865 amino acid region of FluG with a sequence identity of 24% and a similarity of

38%, whereas the 4HPP crystal structure covered the 443–865 amino acid region of FluG, with sequence identity of 22% and a similarity of 33% (**Table 1**).

In order to uncover new features of the protein, we conducted additional studies. Sequence analyses performed using different predictors indicated that the sequence contained neither signal peptides, nuclear localization or export signals nor putative transmembrane domains. However, the PEST predictor marked two potential PEST domains in the C-terminal region (aa571 to aa590 with a score of 14.62 and aa529 to aa541 with a score of 6.84, respectively). Analyses of the genomic DNA and mRNA of *fluG* sequence revealed two predicted introns between nucleotides 1126–1176, and 2420–2472. A previous RNA-seq study (Garzia et al., 2013) reported a single mRNA transcript of 2,598 nucleotides, in which both introns are spliced out.

Localization of FluG *in vivo*

A GFP-tagged version of the protein was used for *in vivo* localization. Strains tagged in the N- and C-terminal regions of the protein were grown in MMA and CMA for 72 h, and their phenotype observed (**Supplementary Figure 1**). The strain tagged in the C-terminal presented a fluffy phenotype, indicative of loss of function, while the N-terminally tagged strain presented a wild type phenotype. Hence, the latter was chosen to perform localization experiments. In order to determine the incubation time at which the protein was sufficiently expressed for observation, the pattern of expression in liquid vegetative culture was monitored by Western blot at time intervals. In the case that *fluG* expression was controlled under the *alcA* promoter, a shift to a medium containing threonine was conducted at time zero. The results revealed that GFP::FluG protein could only be detected in the strain *alcA(p)::GFP::fluG* 2 h after medium shift to threonine containing medium (**Figure 3A**).

Consistent with the results obtained, no GFP-FluG fluorescence was detected in the strain bearing the native *fluG* promoter (not shown). In the strain with the *alcA* inducible promoter, GFP-FluG was localized 2 h after the medium shift in the cytoplasm throughout the length of the hypha. Nuclei were stained by tagging histone H1 tagged with mCherry fluorescence, but no GFP signal was detected in the nuclear compartment as shown in **Figure 3B**. In addition, the protein appeared to be absent from the lumen of vacuoles (white arrows). Taken together, our microscopic observations indicated that FluG was evenly distributed throughout the cytoplasm of vegetative cells.

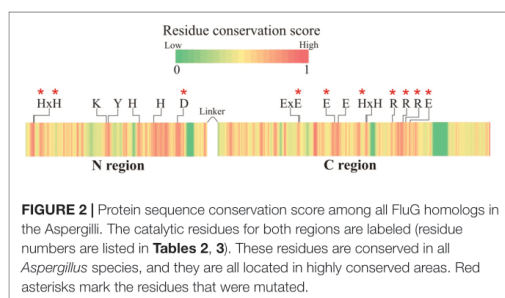
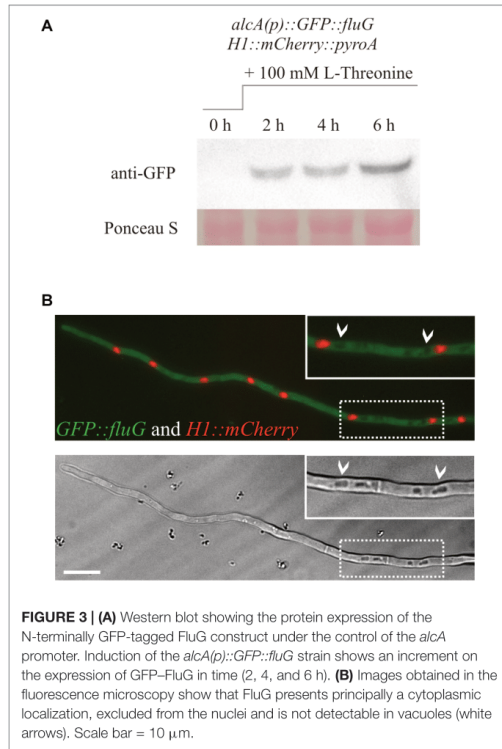


FIGURE 2 | Protein sequence conservation score among all FluG homologs in the Aspergilli. The catalytic residues for both regions are labeled (residue numbers are listed in **Tables 2, 3**). These residues are conserved in all *Aspergillus* species, and they are all located in highly conserved areas. Red asterisks mark the residues that were mutated.

TABLE 1 | Crystal structure homologs to the N- and C-terminal region.

	N-terminal region	C-terminal region	
PDB entry	2QPX	4LNN	4HPP
Coverage (aa)	4–406	429–865	443–865
Seq. identity (%)	25	24	22
Seq. similarity (%)	43	38	33

The coverage is shown using the amino acid numbers of FluG. Sequence identity and amino acid positive matches were calculated by Maestro (Schrödinger Suite).



Computational Analysis of the N- and C-Terminal Regions

The closest homolog to the N-terminal region of FluG, 2QPX, was used as a template to model structural features. The residues shared by both sequences and their predicted functions are shown in **Table 2**. In 2QPX, residues H17, H19 and D317 coordinate

TABLE 2 | Predicted catalytic residues in 2QPX, and their FluG equivalents.

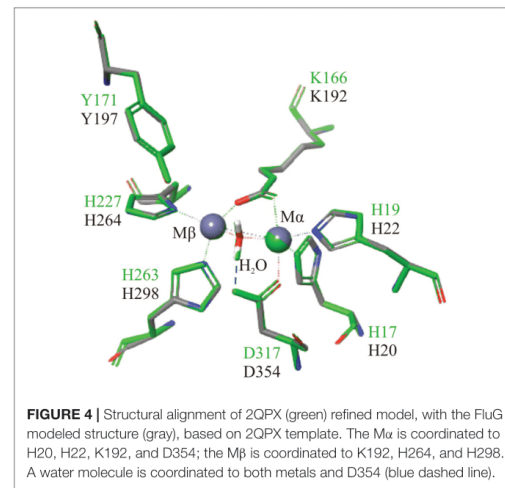
Residues		Predicted role
2QPX	FluG	
H17	H20	Coordinates with the $M\alpha$ metal
H19	H22	Coordinates with the $M\alpha$ metal
K166	K192	Once carbamylated (KCX), bridges both $M\alpha$ and $M\beta$
Y171	Y197	Coordinates with the substrate to aid the cleavage of the bond
H227	H264	Coordinates with $M\beta$
H263	H298	Coordinates with $M\beta$
D317	D354	Coordinates with $M\alpha$

Metals labeled as $M\alpha$ and $M\beta$ correspond to the first and the second Zn^{2+} atoms. The lysine residue (K166) undergoes a post translational modification that results in a carbamylation.

to the first Zn^{2+} ($M\alpha$), whilst H227 and H263 coordinate to the second Zn^{2+} ($M\beta$). In addition, a lysine (K166) undergoes a post-translational carbamylation to bridge both Zn^{2+} ions, and a tyrosine (Y171) is predicted to interact with the substrate in certain amidohydrolases. The N-terminal region of FluG conserves all the above-mentioned residues (H20, H22, K192, H264, H298, and D354), along with an appropriate spatial arrangement to bind and bridge both metals, together with the tyrosine (Y197) that could interact with the substrate (**Figure 4**). These residues are conserved through all the Aspergilli FluG homologs, as marked in **Figure 2**.

Structural alignment of the C-terminal region using the crystal structures of a GSI (4LNN) and a GGL (4HPP), also showed homology in key catalytic residues (**Table 3**). The amino acids that coordinate to the metal ions in both GGL (one Mg^{2+} [$M\alpha$] coordinated to E133, E180, and E187) (**Figure 5A**) and GSI (two Mg^{2+} ; $M\alpha$ coordinated to E134, E189 and E196, and $M\beta$ coordinated to E132, H245, and E333) (**Figure 5B**) were structurally conserved in the C-terminal region of FluG (E566, E626, E633, H682, and E752). Moreover, the residues that bind to the glutamate ligand (R290 in 4HPP; R298 in 4LNN) and interact with ATP (H238, R308, and R313 in 4HPP; N247, R316, and R321 in 4LNN) were present in FluG (R720 for the glutamate; H682, R739, and R744 for the ATP, respectively). The residues listed in **Table 3** are fully conserved in FluG for all the Aspergilli (**Figure 2**).

On the other hand, the GSI crystal structure (4LNN) contains a glutamate residue (E304) that abstracts a proton from the transition state to form glutamine and ADP. It is worth noting, however, that the GGL crystal structure and the FluG (C-terminal) model each contain a tryptophan residue in the same position (W296 and W726, respectively), which cannot fulfill the function of glutamate. Furthermore, the conserved residue D53 in GSI that removes a proton from the ammonium



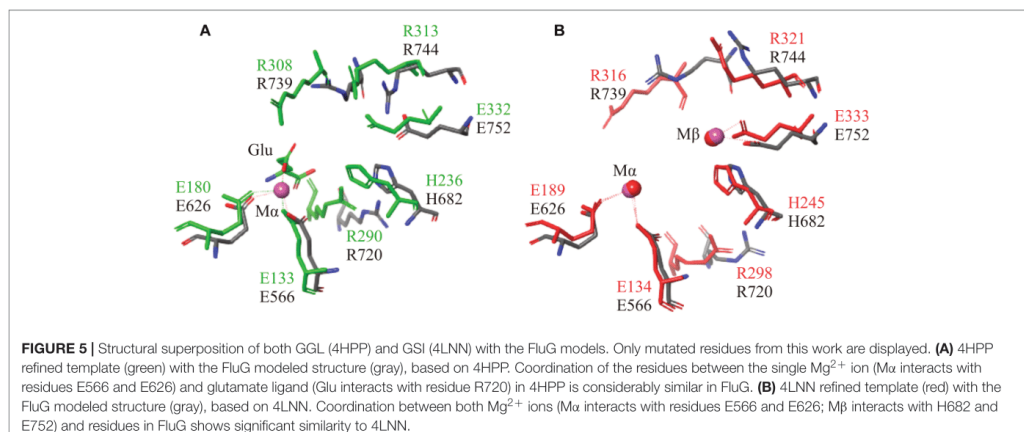


TABLE 3 | Predicted role of the catalytic residues from 4LNN (GSI), 4HPP (GGL), and FluG.

4LNN	Residues		Predicted role
	4HPP	FluG	
D53	V42	S481	Removes a proton from the ammonium ion to create ammonia
E132	E131	E564	Binds $M\beta$
E134	E133	E566	Binds $M\alpha$; susceptible to interact with inhibitors
E189	E180	E626	Binds $M\alpha$ and the NH_3 molecule
E196	E187	E633	Binds $M\alpha$
H245	H236	H682	Binds $M\beta$, via pro nitrogen
N247	H238	H684	Interacts with ATP γ -phosphate
R298	R290	R720	Interacts with the amide group of the glutamate
E304	W296	W726	Abstracts a proton from the transition state to form glutamine and ADP
R316	R308	R739	Polarizes the bound ATP γ -phosphate that forms the γ -glutamyl phosphate
R321	R313	R744	Contacts with the ATP in the transition state
E333	E332	E752	Binds $M\beta$

Metals labeled as $M\alpha$ and $M\beta$ correspond to the first and the second Mg^{2+} atoms. $M\alpha$ and $M\beta$ are located in the first and the second catalytic domain, respectively.

ion to create ammonia is aligned with V42 and S481 in GGL and FluG, respectively; neither of the aforementioned amino acids can perform the role of a GSI.

An important aspect that differentiates GGL and GSI enzymes is the fact GGL forms hexameric rings and GSI enzymes form two hexameric subunits that assemble into a dodecameric unit. The formation of the dodecamer depends on the conformation

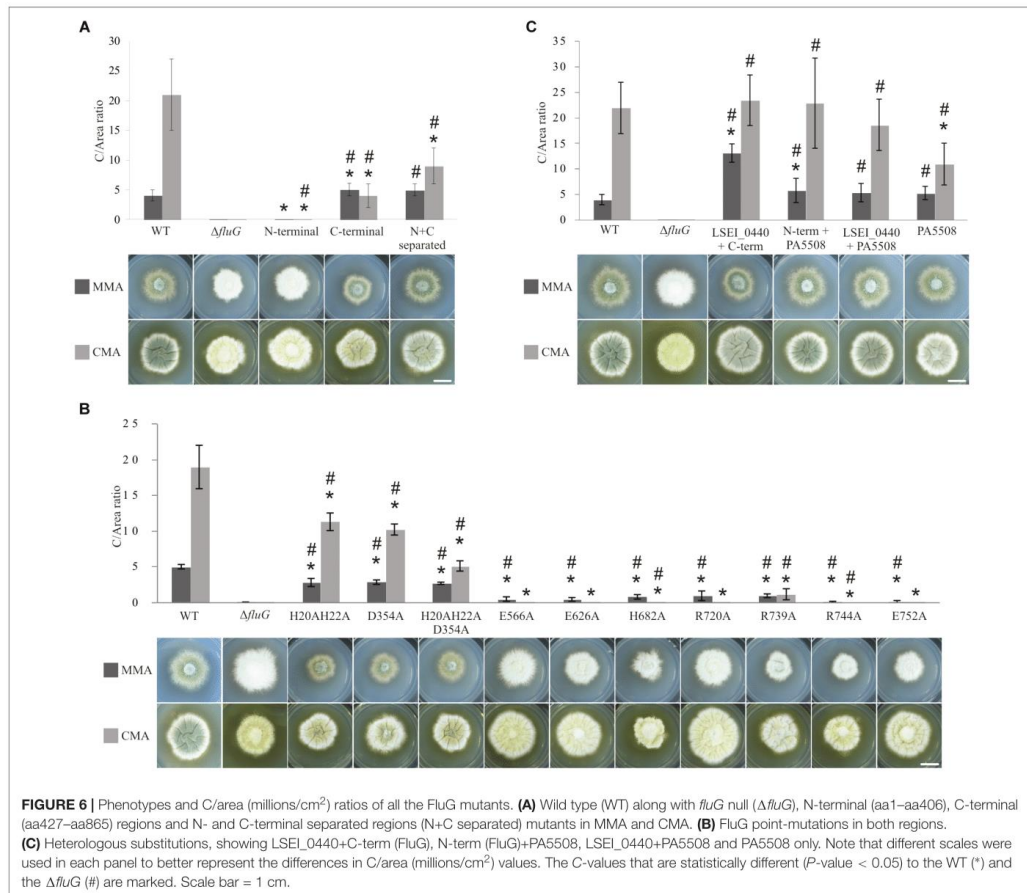
that the C-terminal end of these enzymes adopts. Structural alignments performed with SWISSMODEL using 4LNN and 4HPP crystals revealed that the C-terminal end of FluG exhibited higher QMEAN values with the 4HPP crystal in this region (not shown).

Phenotypic Characterization of WT and $\Delta fluG$ Mutant

The WT and $\Delta fluG$ strains were established as references for comparisons with strains containing modifications, and their phenotypes were characterized in minimal (MMA) and complete medium (CMA). The conidial production in millions per centimeter squared of colony surface (C) in 72 h old colonies of both strains is presented in **Figure 6A**. Numerical values for C and DCM are separately provided in **Supplementary Table 5**. The WT colonies presented a C-value of 4.1 in MMA, distinctly greater than the $\Delta fluG$ strain, 0.02, but significantly lower DCM values. In CMA, the WT strain presented increased C and DCM indices with respect to MMA. The $\Delta fluG$ strain showed even lower conidial counts than in MMA and increased DCM values. Taken together, the results indicate that, under nutrient limitation (MMA), the wild type strain distributes resources between conidiation and growth, while the $\Delta fluG$ mutant destines resources exclusively to growth. However, under nutrient sufficiency (CMA), both strains attained apparently maximum growth levels, and accentuated their differences in conidial production. It is due to these clearly discernible differences, that the C-value was considered as the principal phenotypic indicator of functionality when examining genetically modified strains.

The N- and C-Terminal Regions of FluG Perform Distinct Functions

Each of the two FluG regions was expressed separately under the control of the native promoter. The results shown in **Figure 6A** indicate that in MMA, the mutant expressing only



the C-terminal region presented a C-value significantly greater to that of the WT strain, while in CMA, it was one-fifth of the WT C-value. These results indicate that the C-terminal region was capable of fulfilling the role of the complete FluG polypeptide, but the absence of the N-terminal region limited its efficacy in CMA.

The strain exclusively expressing the N-terminal region, presented a C-value which was significantly similar to that of the $\Delta fluG$ mutant in MMA, but no so in CMA media. These results support the interpretation that the C-terminal region performs the core function of the protein in asexual development, but that the N-terminal region may provide a supporting function under conditions of high nutrient availability.

A strain expressing both N- and C-terminal regions as two separate polypeptides, each under the control of the native promoter of *fluG* was analyzed (N+C separated)

(Figure 6A). The recorded C-value in MMA was significantly similar to that recorded for the WT and C-terminal region strains. In CMA, the value was at an intermediate point between both strains (Supplementary Table 5). These results not only indicate that both regions are functional when separately expressed, but support the view that the N-terminal region performs a relevant supportive role in conidial production, especially when both regions are expressed in the same polypeptide and under nutrient rich conditions.

In order to ascertain that the phenotypes observed were not affected by altered gene expression levels, strains were examined by qPCR and compared to that of the WT type strain, as shown in Supplementary Figure 2. With the exception of the $\Delta fluG$ mutant, all mutant strains presented transcript levels equal or higher than those observed in the WT strain.

Targeted Amino Acid Substitutions Affect Biological Function

Previously reported mutations on residues that were homologous to H20, H22, and D354 in the N-terminal region of FluG had been shown to be essential for amidohydrolase activity (Kim and Kim, 1998; Li et al., 2006; Lohkamp et al., 2006; Nguyen et al., 2009). Therefore, double (H20–H22), single (D354), and triple (H20–H22–D354) alanine substitution mutants were constructed. A similar strategy was followed for the C-terminal region, where residues E566, E626, H682, R720, R739, R744, and E752 were chosen based on previous reports (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Murray et al., 2013). The targeted residues are marked with asterisks in **Figure 2**. All these amino acid substitutions tested negative for propensity to disrupt structure using homology modeling (see “Materials and Methods” section). The observed phenotypes for the full set of mutants are shown in **Figure 6B**.

All the strains carrying mutations in the N-terminal region exhibited significantly lower *C*-values with respect to the WT reference in both media. In MMA, the *C*-values obtained for mutants H20–H22, D354, and H20–H22–D354 were significantly similar. In CMA, however, significant differences between the H20–H22, D354, and H20–H22–D354 mutants were observed with the triple mutant showing the maximum reduction in *C*-value (**Figure 6B**). This indicates an additive effect of the mutations, only under high nutrient availability.

In the C-terminal region, residues E566, E626, H682, R720, R739, R744, and E752 were separately substituted by alanine. All the mutant strains presented statistically lower *C*-values in MMA when compared to the WT. These low values were nevertheless significantly higher than those obtained in the Δ fluG strain, indicating that single amino acid modifications resulted in a partial inactivation of the activity. In CMA, the *C*-values were negligible for the majority of mutants in comparison to the WT strain. When compared to the Δ fluG strain, the majority of the mutants were statistically similar. Three mutants however (H682A, R739A, and R744A) were statistically different, indicating a partial inactivation (**Figure 6B**). Strain R739A, presented a diverging phenotype yielding statistically higher *C*-values in CMA when compared to the other mutants of this region.

The quantification of *fluG* expression in all the tested mutants indicated that the transcript was at least as abundant as in the WT strain (**Supplementary Figure 2**).

Taken together, the results obtained by these substitutions support the view that residues predicted to perform catalytic activity in both N- and C-terminal regions are involved in the biological functions earlier recognized for their corresponding regions.

Heterologous Expression of N- and C-Terminal Region Homologs

Given the sequence and structural homologies observed between both N- and C-terminal regions with those of *Lactobacillus paracasei* (LSEI_0440) and *Pseudomonas*

aeruginosa (PA5508), we constructed strains in which the exogenous sequences were expressed under the control of the *fluG* promoter in combinations that included three protein chimeras (LSEI_0440+C-terminal; N-terminal+PA5508; LSEI_0440+PA5508) and one single polypeptide (PA5508).

The phenotypes of the mutant strains are shown in **Figure 6C**. The *C*-values obtained in the LSEI_0440+C-terminal and N-terminal+PA5508 strains were significantly higher than the WT strain in MMA. In the same conditions, the PA5508 and LSEI_0440+PA5508 exhibited statistically similar *C*-values when compared to the WT strain. On the other hand, the *C*-values of the three protein chimeras (LSEI_0440+C-terminal; N-terminal+PA5508; LSEI_0440+PA5508) were statistically similar to the WT reference in CMA. However, the strain expressing the PA5508 polypeptide alone exhibited a significantly lower value compared to the WT in the same medium.

The results clearly show that the protein encoded by gene LSEI_0440 could functionally replace the N-terminal region of FluG; similarly, the protein encoded by PA5508 fulfilled the role of the C-terminal region of FluG, either as a single polypeptide (PA5508 mutant) or fused to the N-terminal region of FluG (N-terminal+PA5508 chimera). In line with the aforementioned results, the fact that the chimera expressing a fusion protein of LSEI_440 and PA5508 exhibits a statistically comparable phenotype to a WT strain confirms that both bacterial enzymes can work jointly in replacing both FluG regions.

DISCUSSION

This investigation initially attempted to clarify the role of DHO as a conidiation-inducing secondary metabolite in relation to FluG function. Previous evidence that secondary metabolites (such as DHO) may play a role in the induction of sporulation (Márquez-Fernández et al., 2007; Rodríguez-Urra et al., 2012), was in conflict with observations describing a null *ausA* mutant, unable to synthesize DHO, as conidial (Nielsen et al., 2011). This investigation moreover showed that such mutants can produce and transmit the conidiation-inducing factor to an adjacent Δ fluG colony. Thus, DHO-induced conidiation is not functionally related to the FluG pathway. This scenario led us to conduct an updated analysis of the FluG sequence to obtain a molecular outlook on its function.

Preliminary bioinformatic approaches indicated that FluG comprises two putative catalytic units, connected in the same polypeptide by a linker region, which likely function as a bifunctional enzyme performing two independent reactions. *In vivo* fluorescence microscopy experiments confirmed that FluG is localized throughout the cytoplasm, indicating that the protein may participate in a metabolic process that is ubiquitous to the whole mycelium. However, considerable evidence shows that fungal mycelia are spatially and functionally structured. For example, in gene expression (Levin et al., 2007;

Vinck et al., 2011) and protein secretion (Krijgsheld et al., 2012). In this regard, the role of FluG might be hypothesized as the mycelium-wide biosynthesis of a metabolic product or signal specifically required for conidiophore biogenesis. Conidiophores are produced at specific points in the network, likely acting as metabolic sinks. This is in accordance with reported cytosolic streaming directed at the conidiophore (Bleichrodt et al., 2013). Thus, further molecular studies involving FluG function should take the mycelial context into consideration.

The C-terminal region was confirmed as necessary and sufficient for the induction of development and presented clear sequence similarities with both GSI and GGL enzyme sequences. Close examination of the differences between these two types of enzymes revealed that FluG more closely matches the latter (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Takeo et al., 2013). To address this point, a site-directed mutational approach was planned to determine the importance of the predicted catalytic residues present in GSI and GGL. However, GSI catalytic activity involves the interaction between two residues (a glutamate and an aspartate) that shield the γ -glutamyl phosphate intermediate and deprotonate ammonium (forming ammonia) to attack the γ -glutamyl phosphate (Murray et al., 2013). Interestingly, these key acidic residues are not conserved in the sequences of GGL, FluG or those GSI homologs that reportedly do not catalyze the synthesis of glutamine, but γ -glutamylation reactions (Kurihara et al., 2008; Ladner et al., 2012; Takeo et al., 2013; Krysenko et al., 2017). On the other hand, residues acting on metal binding and glutamate orientation are usually conserved among these enzymes (Ladner et al., 2012), as was confirmed in FluG. The attachment of glutamate has been attributed to exert a scaffolding or protective role on substrates destined to specific metabolic fates (Walker and van der Donk, 2016), as will be discussed below. The strain in which the GGL coded by PA5508 replaced the C-terminal region of FluG recovered the functionality of the WT strain in all tested mutants and conditions. Earlier reports associated this gene with the polyamine utilization pathway along with six other paralog genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Surprisingly, PA5508 was the only gene that was not induced by polyamine substrates (Yao et al., 2011). Later investigations performed by Ladner et al. (2012) showed that the enzymatic substrate preference of PA5508 was stronger for bulky amines (catecholamines) rather than linear amines (polyamines). Whether the substrate employed by the FluG C-terminal region bears any resemblance to the ones elucidated by Ladner et al. (2012) is a question that is being actively followed up.

Another notable difference between GGL and GSI enzymes is that GGL forms single hexameric rings, whilst GSI enzymes form two hexameric rings which then arrange to form a dodecameric unit. This assembly occurs via the C-terminal helix of the polypeptide, known as the “helical thong,” that extends away from the rest of the subunit and interacts with the second hexameric ring. In GGL, however, the C-terminal helix is curved toward the protein, preventing it from interacting with another ring (Ladner et al., 2012). Our

structural alignments revealed that the FluG C-terminal end exhibited higher structural similarities with the GGL, thus suggesting that it might also adopt a similar “helical thong” conformation. Furthermore, this evidence might also explain the loss of function observed in this study when tagging FluG at the C-terminus.

The putative amidohydrolase sequence contained in the N-terminal region of FluG is a member of a well-studied superfamily of enzymes that share common structural features. The vast majority of the amidohydrolase crystal structures display a characteristic TIM-barrel fold consisting of eight parallel β -strands connected by eight α -helices. Furthermore, they share conserved metal ligands and catalytically important residues, that bind one or two metal ions acting as catalytic sites, together with four histidines and one aspartate acting as catalytic bonds (Seibert and Raushel, 2005). These motifs are all present in the N-terminal region of FluG, coupled with the structural conservation of a lysine and a tyrosine that could bridge both metals and bind to the substrate, respectively (Hsieh et al., 2013). The phenotypic analysis of the H20A–H22A double mutant and the single D354A mutant showed partial inactivation, and the triple H20A–H22A–D354A mutant displayed greater level of functional inactivation suggesting an additive effect. This result is consistent with the reported importance that these residues have in the coordination of the M α ; the process is followed by the lysine carbamylation, a necessary step to bind the M β (Hsieh et al., 2013). Moreover, the phenotype shown by the triple mutant resembled the one observed in the mutant lacking the whole region.

Although details of the reaction purportedly catalyzed by the N-terminal region of FluG remain unresolved at this point, the predicted structural features point to the hydrolysis of a bond, excluding deaminase (elimination of ammonia from aromatic bases) activity. Alignments based exclusively on proteins with solved crystal structures, showed a notable residue conservation between the N-terminal region of FluG and LSEI_0440. Furthermore, both enzymes exhibited strong similarities with cyclic amidohydrolases (Nam et al., 2005), such as dihydropyrimidinases (Lohkamp et al., 2006; Hsieh et al., 2013) and hydantoinases (Cheon et al., 2002) that take part in the pyrimidine degradation pathway. Unfortunately, although LSEI_0440 could functionally replace the amidohydrolase region of FluG, the actual activity of this enzyme remains unknown. Previous reports on the occurrence of promiscuous enzymes among the amidohydrolase superfamily (Baier et al., 2016) should be taken into consideration, when evaluating the functional replacement of the N-terminal of FluG by LSEI_0440. Bearing in mind that the amidohydrolase superfamily has emerged from a common ancestor (Seibert and Raushel, 2005) and that ancestral enzymes may have multifunctional (non-specialized) or promiscuous catalytic activity (Baier et al., 2016), LSEI_0440 might as well retain enzymatic characteristics that confer substrate or catalytic promiscuity, compared to a more specialized role of the N-terminal of FluG. On the other hand, the inherent Michaelis constant

that LSEI_0440 or the N-terminal of FluG have, might as well differ; considering that the LSEI_0440 substitution leads to a highly sporulating phenotype, it suggests that this enzyme could have a lower K_M . Conversely, evidence of possible post translational modifications in FluG (Lee and Adams, 1994) could explain the inability of the LSEI_0440+C-terminal strain to maintain wild type C-values in the tested conditions. It is likely that the N-terminal of FluG might have a regulatory domain that has not been uncovered by the predictors. Ongoing experiments for the clarification of this aspect of FluG function are currently underway.

The combined results of this investigation indicate that FluG may function as a bifunctional enzyme with each domain sharing high similarities to its' respective prokaryotic homologs. In prokaryotes, they may or may not participate in a common metabolic pathway, but in *Aspergilli*, they are joined by a linker region to form a bifunctional enzyme. Supporting this relation, the mutant in which both N- and C-terminal regions were substituted by LSEI_0440 and PA5508, respectively, restored *in vivo* functionality. The occurrence of genes that code for more than one enzyme has been attributed to fusion and fission events driven by paralogous evolution from bacteria to fungi (Mathis et al., 2000) or between different fungal species via chromosomal translocation or chromosomal inversion (Leonard and Richards, 2012). In bacterial gene clusters, close disposition between predicted GSI and amidohydrolase sequences is apparent, possibly indicating a functional connection (Strong et al., 2003; Iyer et al., 2009). However, the phenotypic effect caused by the separation of the N- and C-terminal region confirms that both proteins perform their roles more efficiently as a single polypeptide, than as two separate entities. However, our experimental methods and conditions may not have bridged the specific conditions that optimization provided by the linkage of the two halves of FluG solved over the course of evolution of FluG. Surely, the totality of inputs into developmental decisions of *Aspergilli* have not been elucidated. The unresolved questions of FluGs specifics leave the door open to new discoveries in this field. In any case, our results consistently support the view that the N-terminal amidohydrolase activity plays a supporting role to the essential C-terminal catalytic activity, especially under nutrient rich conditions.

In functional terms, the N-terminal amidohydrolase activity is not necessary for the induction of asexual development but is required to maintain the C-value of the colony under conditions of high nutrient availability. This finding could be explained by a model where the amidohydrolase could utilize an accumulating metabolic intermediate as a substrate that would otherwise be consumed by an alternative pathway, possibly supporting vegetative growth. The product of the amidohydrolase reaction, in turn, could constitute a substrate of the C-terminal region, as an element of a metabolic branch which could feed into a development-related pathway. The hypothetical role of these pathways would be to scavenge nitrogen-rich intermediates through glutamylation in order to feed alternative pathways (Walker and van

der Donk, 2016). Furthermore, nitrogen acquisition through glutamylated intermediates in bacteria has been reported to occur in the biosynthesis of polyamines (Kurihara et al., 2008; Krysenko et al., 2017) and certain catecholamines (Ladner et al., 2012; Takeo et al., 2013). Regardless of the predictions obtained for the C-terminal GSI enzymatic nature to date, phenotypic evidence obtained in this investigation sustains that FluG performs the γ -glutamylation reaction of yet unknown compounds, assisted by the N-terminal region. Given this scenario, it would seem that the purported substrate of FluG could undergo at least two metabolic fates, namely the promotion of growth, as observed in mutants affected in C-terminal activity, or asexual development. The intracellular pool of that substrate may be much greater under high nutrient availability and scavenging by the N-terminal amidohydrolase activity may be an important factor in balancing the ratio of growth and asexual development within the colony.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MI-S conducted and designed the experimental work, analyzed the data, and wrote the manuscript. LT-G conducted and designed the experimental work, carried out the statistical treatment of the results, and revised the manuscript. MC contributed to the bioinformatic approach, validated the final predictions, and revised the manuscript. UU co-conceived the work, ensured the scientific issue was appropriately investigated, ensured the integrity of the work, contributed to writing the manuscript, and revised and approved the final version for submission.

FUNDING

This work was supported by the Basque Government through the grant IT599-13 to UU. MI-S currently holds a predoctoral fellowship PIF2014/224 granted by the University of the Basque Country (UPV/EHU).

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge Gaspar Pérez and M^a Jesús Yebra from IATA-CSIC (Valencia, Spain) for providing the *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 and Norio Takeshita from University of Tsukuba (Tsukuba, Japan) for providing the pNT5 plasmid. We express our gratitude to Dr. Eider San Sebastian for the guidance with Schrödinger Suites.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00778/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35–54.
- Baier, F., Copp, J. N., and Tokuriki, N. (2016). Evolution of enzyme superfamilies: comprehensive exploration of sequence-function relationships. *Biochem.* 55, 6375–6388. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00723
- Benkert, P., Künzli, M., and Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 37, W510–W514. doi: 10.1093/nar/gkp322
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., et al. (2002). The protein data bank. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 58, 899–907. doi: 10.1107/S0907444902003451
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252–W258. doi: 10.1093/nar/gku340
- Bleichrodt, R., Vinck, A., Krijgheld, P., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., and Wösten, H. A. (2013). Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*. *Stud. Mycol.* 74, 31–46. doi: 10.3114/sim0007
- Capra, J. A., and Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics* 23, 1875–1882. doi: 10.1093/bioinformatics/btm270
- Chang, P. K., Scharfenstein, L. L., Mack, B., and Ehrlich, K. C. (2012). Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans* *fluG* reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7557–7563. doi: 10.1128/AEM.01241-12
- Cheon, Y. H., Kim, H. S., Han, K. H., Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D., et al. (2002). Crystal structure of D-Hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into the stereochemistry of enantioselectivity. *Biochemistry* 41, 9410–9417. doi: 10.1021/bi0201567
- Clarke, K. R., and Gorley, R. N. (2006). *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. Plymouth: PRIMER-E.
- Doskočilová, A., Plihal, O., Volc, J., Chumová, J., Kourová, H., Halada, P., et al. (2011). A nodulin/glutamine synthetase-like fusion protein is implicated in the regulation of root morphogenesis and in signalling triggered by flagellin. *Planta* 234, 459–476. doi: 10.1007/s00425-011-1419-7
- D'Souza, C. A., Lee, B. N., and Adams, T. H. (2001). Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 158, 1027–1036.
- Dyer, P. S., and O'Gorman, C. M. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 165–192. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x
- Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., Varcza, Z., and Pócsi, I. (2005). The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol. Res.* 109(Pt 7), 757–763. doi: 10.1017/S0953756205003023
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Fischer, R., Espeso, E. A., and Ugalde, U. (2009). *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* 71, 172–184. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06520.x
- Garzia, A., Etxebeste, O., Rodríguez-Romero, J., Fischer, R., Espeso, E. A., and Ugalde, U. (2013). Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 12, 311–321. doi: 10.1128/EC.00274-12
- Grubbs, F. E. (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11, 1–21. doi: 10.1080/00401706.1969.10490657
- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., et al. (2016). OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 12, 281–296. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00864
- Hervás-Aguilar, A., and Peñalva, M. A. (2010). Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 9, 1504–1518. doi: 10.1128/EC.00119-10
- Hsieh, Y. C., Chen, M. C., Hsu, C. C., Chan, S. L., Yang, Y. S., and Chen, C. J. (2013). Crystal structures of vertebrate dihydropyrimidinase and complexes from *Tetraodon nigroviridis* with lysine carbamylation metal and structural requirements for post-translational modification and function. *J. Biol. Chem.* 288, 30645–30658. doi: 10.1074/jbc.M113.496778
- Iyer, L. M., Abhiman, S., Maxwell Burroughs, A., and Aravind, L. (2009). Amidoligases with ATP-grasp, glutamine synthetase-like and acetyltransferase-like domains: synthesis of novel metabolites and peptide modifications of proteins. *Mol. Biosyst.* 5, 1636–1660. doi: 10.1039/b917682a
- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J. F., Honig, B., Shaw, D. E., et al. (2004). A hierarchical approach to All-atom protein loop prediction. *Proteins* 55, 351–367. doi: 10.1002/prot.10613
- Käfer, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217–232.
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B. J., et al. (2018). Ensembl genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res.* 46, D802–D808. doi: 10.1093/nar/gkx1011
- Kim, G. J., and Kim, H. S. (1998). Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring. *Biochem. J.* 330(Pt 1), 295–302. doi: 10.1042/bj3300295
- Korbie, D. J., and Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3, 1452–1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133
- Krijgheld, P., Altelaar, A. F., Post, H., Ringrose, J. H., Müller, W. H., Heck, A. J., et al. (2012). Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *Aspergillus niger*. *J. Proteome Res.* 11, 2807–2818. doi: 10.1021/pr201157b
- Krysenko, S., Okoniewski, N., Kulik, A., Matthews, A., Grimpo, J., Wohlleben, W., et al. (2017). Gamma-glutamylpolyamine synthetase GlnA3 is involved in the first step of polyamine degradation pathway in *Streptomyces coelicolor* M145. *Front. Microbiol.* 8:726. doi: 10.3389/fmicb.2017.00726
- Kurihara, S., Oda, S., Tsuboi, Y., Kim, H. G., Oshida, M., Kumagai, H., et al. (2008). γ -Glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 283, 19981–19990. doi: 10.1074/jbc.M800133200
- la Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 527–536. doi: 10.1093/protein/gzh062
- Ladner, J. E., Atanasova, V., Dolezelova, Z., and Parsons, J. F. (2012). Structure and activity of PA5508, a hexameric glutamine synthetase homologue. *Biochemistry* 51, 10121–10123. doi: 10.1021/bi3014856
- Lee, B. N., and Adams, T. H. (1994). The *Aspergillus nidulans* *fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev.* 8, 641–651. doi: 10.1101/gad.8.6.641
- Leonard, G., and Richards, T. A. (2012). Genome-scale comparative analysis of gene fusions, gene fissions, and the fungal tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 21402–21407. doi: 10.1073/pnas.1210909110
- Levin, A. M., de Vries, R. P., Conesa, A., de Bekker, C., Talon, M., Menke, H. H., et al. (2007). Spatial differentiation in the vegetative mycelium of *Aspergillus niger*. *Eukaryot. Cell* 6, 2311–2322. doi: 10.1128/EC.00244-07
- Li, H. X., Lu, Z. M., Zhu, Q., Gong, J. S., Geng, Y., Shi, J. S., et al. (2017). Comparative transcriptomic and proteomic analyses reveal a FluG-mediated signaling pathway relating to asexual sporulation of *Antrodia camphorata*. *Proteomics* 17, 17–18. doi: 10.1002/pmic.201700256
- Li, T., Iwaki, H., Fu, R., Hasegawa, Y., Zhang, H., and Liu, A. (2006). α -amino- β -carboxymuconic- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD) is a new member of the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 45, 6628–6634. doi: 10.1021/bi060108c
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., et al. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–W584. doi: 10.1093/nar/gkv279
- Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J., and Dobritzsch, D. (2006). The crystal structures of dihydropyrimidinases reaffirm the close relationship between cyclic amidohydrolases and explain their substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 281, 13762–13776. doi: 10.1074/jbc.M513266200
- Mah, J. H., and Yu, J. H. (2006). Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 5, 1585–1595. doi: 10.1128/EC.00192-06
- Margelis, S., D'Souza, C., Small, A. J., Hynes, M. J., Adams, T. H., and Davis, M. A. (2001). Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in

- Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 183, 5826–5833. doi: 10.1128/JB.183.20.5826-5833.2001
- Markina-Inarrairaegui, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Aratújo-Bazán, L., Fernández-Martínez, J., Flores, J. A., et al. (2011). Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 22, 3874–3886. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0262
- Márquez-Fernández, O., Trigos, Á., Ramos-Balderas, J. L., Viniestra-González, G., Deising, H. B., and Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot. Cell* 6, 710–720. doi: 10.1128/EC.00362-06
- Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y., and Cullimore, J. V. (2000). The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *J. Mol. Evol.* 50, 116–122. doi: 10.1007/s002399910013
- Mathis, R., Grosjean, C., de Billy, F., Huguet, T., and Gamas, P. (1999). The early nodulin gene MtN6 is a novel marker for events preceding infection of *Medicago truncatula* roots by *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 544–555. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.6.544
- Murray, D. S., Chinnam, N., Tonthat, N. K., Whitfill, T., Wray, LV Jr., Fisher, S. H., et al. (2013). Structures of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase dodecamer reveal large intersubunit catalytic conformational changes linked to a unique feedback inhibition mechanism. *J. Biol. Chem.* 288, 35801–35811. doi: 10.1074/jbc.M113.519496
- Nam, S. H., Park, H. S., and Kim, H. S. (2005). Evolutionary relationship and application of a superfamily of cyclic amidohydrolase enzymes. *Chem. Rec.* 5, 298–307. doi: 10.1002/tcr.20057
- Nguyen, T. T., Fedorov, A. A., Williams, L., Fedorov, E. V., Li, Y., Xu, C., et al. (2009). The mechanism of the reaction catalyzed by uronate isomerase illustrates how an isomerase may have evolved from a hydrolase within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 48, 8879–8890. doi: 10.1021/bi901046x
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple hidden Markov model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinform.* 10:202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. Jr., and Deerfield, D. W. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet J.* 4, 1–4.
- Nielsen, H. (2017). "Predicting secretory proteins with signalP" in *Protein Function Prediction*, 1st Edn, ed. D. Kihara (New York, NY: Humana Press), 59–73. doi: 10.1007/978-1-4939-7015-5_6
- Nielsen, M. L., Nielsen, J. B., Rank, C., Klejnstrup, M. L., Holm, D. K., Brogaard, K. H., et al. (2011). A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 321, 157–166. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02327.x
- Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F. J., Takahashi, T., and Koyama, Y. (2010). Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 10–18. doi: 10.1016/j.fgb.2009.10.004
- Peñalva, M. A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975. doi: 10.1016/j.fgb.2005.09.004
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D., and Bufton, A. W. J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advan. Genet.* 5, 141–238. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60408-3
- R Core Team. (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10031-1
- Rexer, H. U., Schäberle, T., Wohlleben, W., and Engels, A. (2006). Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch. Microbiol.* 186, 447–458. doi: 10.1007/s00203-006-0159-8
- Rodríguez-Urra, A. B., Jimenez, C., Nieto, M. I., Rodríguez, J., Hayashi, H., and Ugalde, U. (2012). Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol.* 7, 599–606. doi: 10.1021/cb200455u
- Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27, 221–234. doi: 10.1007/s10822-013-9644-8
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., et al. (2015). The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 659–674. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0411-R
- Seibert, C. M., and Raushel, F. M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 44, 6383–6391. doi: 10.1021/bi047326v
- Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., and Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21, 681–691. doi: 10.1007/s10822-007-9133-z
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., and Sherman, W. (2010). Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 1509–1519. doi: 10.1021/ct900587b
- Silva, L. S., Seabra, A. R., Leitão, J. N., and Carvalho, H. G. (2015). Possible role of glutamine synthetase of the prokaryotic type (GSI-like) in nitrogen signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Sci.* 240, 98–108. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.001
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998). "A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences," in *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, eds J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen (Menlo Park, CA: AAAI Press), 175–182.
- Strong, M., Mallick, P., Pellegrini, M., Thompson, M. J., and Eisenberg, D. (2003). Inference of protein function and protein linkages in *Mycobacterium tuberculosis* based on prokaryotic genome organization: a combined computational approach. *Genome Biol.* 4:R59. doi: 10.1186/gb-2003-4-9-r59
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., et al. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1, 3111–3120. doi: 10.1038/nprot.2006.405
- Takeo, M., Ohara, A., Sakae, S., Okamoto, Y., Kitamura, C., Kato, D., et al. (2013). Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ -Glutamylanilide. *J. Bacteriol.* 195, 4406–4414. doi: 10.1128/JB.00397-13
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S., and Fischer, R. (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 19, 339–351. doi: 10.1091/mbc.E07-06-0523
- Tilburn, J., Scaccocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., and Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221. doi: 10.1016/0378-1119(83)90191-9
- Trevaskis, B., Wandrey, M., Colebatch, G., and Udvardi, M. K. (2002). The soybean GmN6L gene encodes a late nodulin expressed in the infected zone of nitrogen-fixing nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 630–636. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.7.630
- Vinck, A., de Bekker, C., Ossin, A., Ohm, R. A., de Vries, R. P., and Wösten, H. A. B. (2011). Heterogenic expression of genes encoding secreted proteins at the periphery of *Aspergillus niger* colonies. *Environ. Microbiol.* 13, 216–225. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02322.x
- Walker, M. C., and van der Donk, W. A. (2016). The many roles of glutamate in metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 419–430. doi: 10.1007/s10295-015-1665-y
- Wang, F., Krijgheld, P., Hulsman, M., de Bekker, C., Müller, W. H., Reinders, M., et al. (2015). FluG affects secretion in colonies of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 225–240. doi: 10.1007/s10482-014-0321-2
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- Yager, L. N., Lee, H. O., Nagle, D. L., and Zimmerman, J. E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149, 1777–1786.

- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P. C., et al. (2004). Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1359–1362. doi: 10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004
- Yao, X., He, W., and Lu, C. D. (2011). Functional characterization of seven γ -Glutamylpolyamine synthetase genes and the bauRABCD locus for polyamine and β -Alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 193, 3923–3930. doi: 10.1128/JB.05105-11
- Yu, J. H., Mah, J. H., and Seo, J. A. (2006). Growth and developmental control in the model and pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryot. Cell* 5, 1577–1584. doi: 10.1128/EC.00193-06
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Iradi-Serrano, Tola-García, Cortese and Ugalde. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

