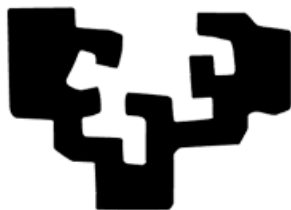


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Química / Kimika fakultatea

Kimikako gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

Analisi teknika genomiko, proteomiko eta zelularrak harizpi itxurako
onddoen andui errekonbinanteak sortu eta aztertzeko

Egilea: Endika Diez Olaetxea

Zuzendaria: Oier Etxebeste Juárez

Donostia, 2020ko Ekaina

GIPUZKOAKO CAMPUSA
CAMPUS DE GIPUZKOA
Manuel Lardizabal pasealekua, 3
20018 DONOSTIA - SAN SEBASTIAN
GIPUZKOA

Aurkibidea

1. Laburpena/Abstract	5
2. Sarrera	7
2.1. <i>Aspergillus nidulans</i> modelo organismo bezala.....	7
2.2. Kontrol genetikoaren konidioforoen garapenean	10
2.3. Garraio nukleo-zitoplasmatikoa eta bere parte-hartze hipotetikoa FlbB-ren metaketa nuklearrean.....	12
2.4. Helburuak.....	14
3. Materialak eta metodoak	15
3.1. Kultura baldintzak eta medioak.....	15
3.2. Erabilitako anduiak eta oligonukleotidoak.....	17
3.3. Teknika esperimentalak.....	18
3.4. Azterketa bioinformatikoa.....	26
4. Emaitzak	29
4.1. Mutante termosentikorren ezaugarritze fenotipikoa.....	29
4.2. Mutanteen sekuentziazioa eta analisi bioinformatikoa.....	31
4.3. KapA mutatuak eta GFP::FlbB kimerak adierazten dituzten andui errekombinanteen sorrera eta ezaugarritze fenotipikoa.....	40
5. Eztatbaida	45
6. Ondorioak/Conclusions	49
7. Bibliografia	51

1. Laburpena

Gratu Amaierako Lan (GrAL) honen helburua biologia molekularreko eta konputazionalako oinarriko hainbat teknika ulertu eta lantzea izan da, metodo esperimental eta prozesu bioinformatikoak jorratuz. Horretarako, *Aspergillus nidulans* onddoa erabili da erreferentzia sistema bezala, bere manipulazio genetikoa prozedura estandarren arabera egin baitaiteke modu errazean eta epe motzean, gainera patogenoa izan gabe. Zehazki, KapA α -inportina proteinaren, zeinak kargo proteinen garraioa ahalbidetzen duen zitoplasmatik nukleora, eta FlbB transkripzio faktorearen, zeinak garapen asexuala kontrolatzen duen, arteko harreman hipotetiko bat aztertu nahi izan da GrAL honetan. Abiapuntua α -inportinaren bi mutante termosentikor izan dira. Termino honek giro-tenperaturaren funtzionalak diren formak direla esan nahi du, baina 37 °C-tan, tenperatura errestriktiboan, funtzionaltasuna galtzen dute. Mutazio hauek 37 °C-tan FlbB-ren zelula barneko lokalizazio karakteristikoa aldatzen duten aztertu nahi izan da. Horretarako, analisi fenotipikoak, onddo laginen kulturarako prozedurak, DNA erauzketa prozesuak, zelulen transformazioa eta PCR erreakzioak burutu dira. Tresna bioinformatikoak ere aplikatu dira α -inportinaren mutazioek bere egitura hirudimentsionalean izan lezaketen eragina aztertzeko. Emaitzei erreparatuz baieztatu daiteke bi proteinen artean harreman genetiko bat dagoela, GFP::FlbB eta KapA::mRFP kimeren forma basatiak adierazten dituzten anduiek esporea asexualen ekoizpenean galera nabaria erakusten baitute. Harreman hori molekularki baieztatzeke aukerarik balego, FlbB-ren zitoplasmatik nukleorako garraioa noiz eta nola ematen den ulertzen lagunduko luke, dagokien geneen adierazpena aktibatu edo inhibitzeke gaitasuna emanik.

1. Abstract

The main objective of this end-of-degree project has been the understanding and training in molecular and computational biology tools. With this aim, the fungus *Aspergillus nidulans* has been used as the reference system, because procedures for its genetic manipulation are standard and highly accessible at the lab scale, and besides, it is not a pathogen. In this project, a hypothetical relationship between importin- α , which transports cargo proteins from the cytoplasm to nuclei, and the transcription factor FlbB, which controls asexual development, has been analysed. Two thermosensitive mutants of the importin- α homologue, KapA, have been used as the starting point. Thermosensitivity means that KapA is functional at 30 °C but not at the restrictive temperature of 37 °C. Any possible variation in the subcellular localization of FlbB at 37 °C in these mutant genetic backgrounds has been analysed. That implied carrying out phenotypic analyses, the application of cell-culture procedures, DNA extraction, cell-transformations and multiple PCR reactions. Bioinformatics tools have also been applied to assess the effect that the corresponding importin- α mutations could have on its three-dimensional structure. Results suggest that there is a genetic relationship between both genes, since strains simultaneously expressing GFP::FlbB and KapA::mRFP chimeras show a decreased production of asexual spores. If that hypothetic relationship could be shown by molecular tools, that would render important information about when and how occurs the import of FlbB from the cytoplasm into the nucleus, in order to induce or repress the expression of target genes.

2. Sarrera

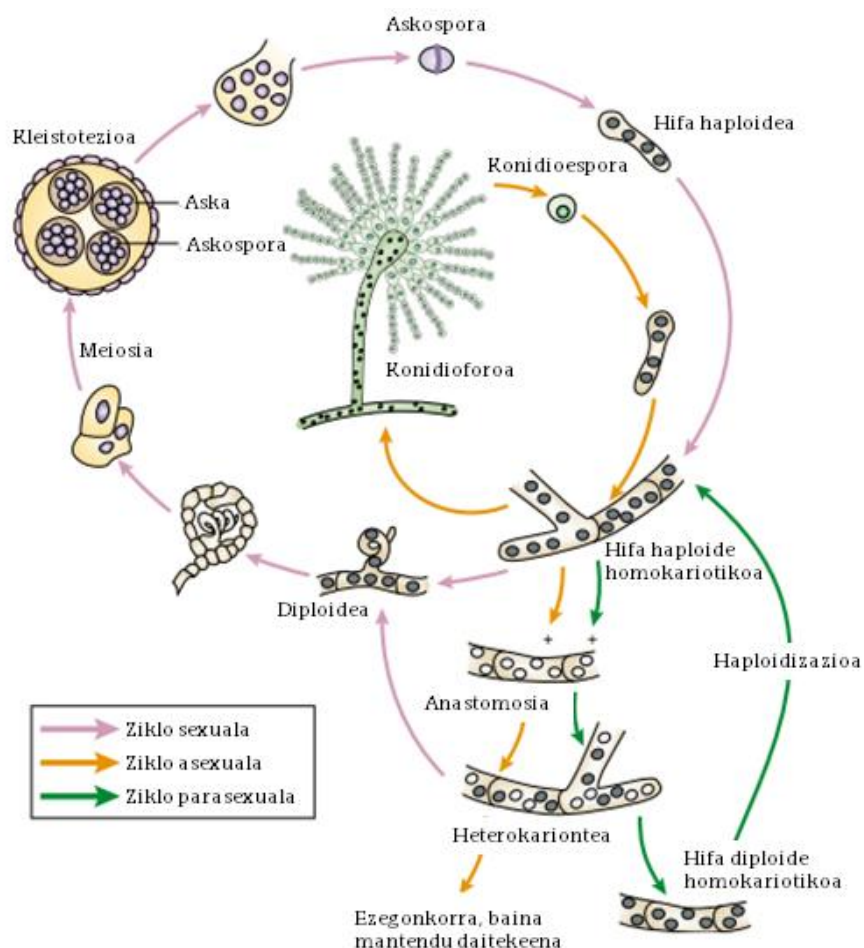
2.1. *Aspergillus nidulans* modelo organismo bezala

Aspergillus nidulans askomizetoen *phylum*-eko eta *Trichocomaceae* familiako harizpi-itxurako onddo bat da [1]. Haren sekuentzia genomikoa ezaguna da 2005. urtetik, 30 milioi nukleotido inguru ditu eta gutxi gorabehera 10000 gene 8 kromosomatan antolatuta [2]. Morfologiari eta antolaketa zelularri dagokionez, harizpi itxurako onddoak definitzen dituen zelula mota hifa izenekoak da. Zelula begetatibo hauek itxura tubularra dute, eta *Aspergillus nidulans*-en hifen kasuan, sinzitalak eta homokariotikoak dira (nukleo anitzekoak eta haien artean genetikoki berdinak, hurrenez hurren). Orokorrean, nukleo horiek haploideak dira, kasu batzuetan nukleo diploideak ere osa ditzakeen arren (informazio genetikoaren kopia bakarra edo bi, nukleo bakoitzeko, hurrenez hurren).

Hifak esporak ernamuintzean sortzen dira. Espora horiek sexualak edo asexualak izan daitezke, askospora edo konidiospora izenez ezagutzen direlarik, hurrenez hurren (ikus aurrerago; ikus ere S1 irudia). Hifa hauek modu hiperpolarizatuan hazten dira, asimetricoki, punta izena duen puntu bakarretik, alegia. Horretarako, mintz plasmaticoa eta pareta zelularra sortzeko behar diren material guztiak (lipido, proteina eta karbohidratoak) puntara garraiatuak izan behar dira. *A. nidulans*-en hifek ere adarkatzea jasan dezakete eta bi hifa desberdinen puntak fusionatu ere egin daitezke anastomosi deritzon prozesu baten bitartez [3]. Era honetan, hifak haien artean gurutzatzean eta fusionatzean mizelio izeneko sarea eratzen da, hau izango delarik kultura medio solido batean modu simetrikoki eta erradialean haziko dena. Hazkuntzak aurrera egiten duen heinean kolonia zirkularrak sortuko dira, eta hortik abiatuta konidiosporak (ikus aurrerago) [4].

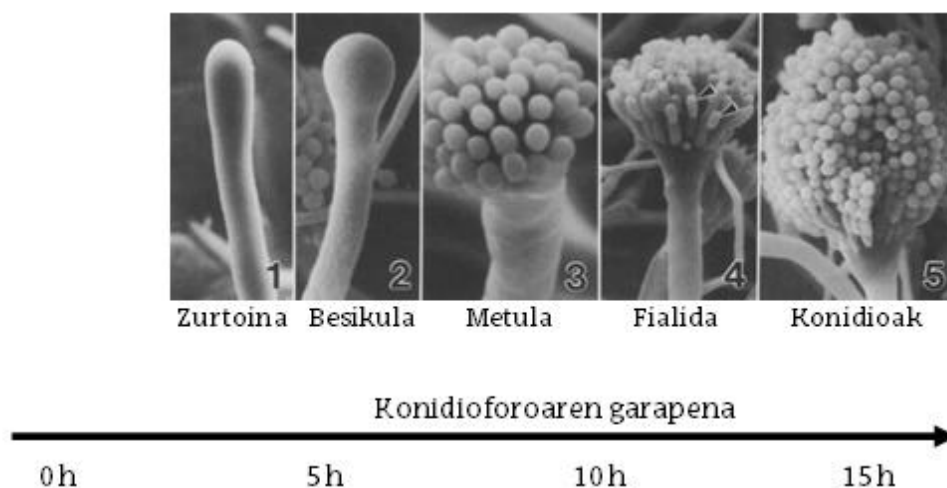
Bestetik, hifek ingurunearen baldintzak neurtzeko mekanismoak dituzte, eta horien arabera garapen zikloak aktibatzen dituzte. *Aspergillus nidulans* onddoaren bizi-zikloan hiru garapen fase bereizten dira: sexuala, parasexuala eta asexuala (ikus S1 irudia). Ziklo sexualean, kleistotezio izeneko egitura esferikoak osatzen dira. Horretarako, lehenik, bi hifa homokariotikoen anastomosisia (fusioa) ematen da hifa heterokariotikoa eratuz (eduki

desberdineko bi nukleo mota dituen hifa egitura). Nukleo desberdin biren fusioa eman eta hifa diploidea sortzen da, zeinak meiosi prozesua jarraituko duen (zelula diploide batetik lau zelula haploide lortzeko zatiketa zelularren prozesua), aska izeneko zakuak emanik. Aska bakoitzean 8 askospora eratuko dira (espora sexualak eta haploideak). Kleistotezio bakoitzak milioika aska eta askospora izango ditu, gerora askatuz eta baldintza egokietan, hifa haploide berriak sortuko dituztenak. Ziklo parasexualari dagokionez, hifa homokariotikoen anastomosisia ematen da ere hifa heterokariotikoak osatzeko, baina oraingoan nukleoaren fusioa ez da beti gertatzen eta hauek haploide mantentzen dira. Nukleo batzuk, ordea, haien artean fusioa daitezke eta diploide homokariotikoak eratu, gerora manipulatuak izan daitezkeenak haploidizazioa (diploidetik haploidera bueltatzea) burutzeko [1; 5].



S1. Irudia: *Aspergillus nidulans* onddoaren bizi-zikloa. Ziklo bakoitzean, sexuala, parasexuala eta asexualean, ematen diren pauso garrantzitsuenak biltzen dira, hiruak hifetatik abiatzen direlarik. [5]. erreferentziatik lortua eta moldatua.

Ziklo asexualean, konidioforo izeneko egituren garapena ematen da (ikus S2 irudia). Konidioforo bakoitzak milaka espora asexual edo konidio izango ditu, eta konidio horiek izango dira leku berrietara barreiatzeko onddoak erabiliko duen bitarteko nagusiak. Garapen prozesu hau hainbat pausotan ematen da. Lehenik, hifa jakin batzuetan (ezezaguna da zeintzuk), puntatik urruti dauden guneeetan, oin zelula izeneko egitura osatzen da. Oin zelulak pareta zelular sendoagoa du eta konidioforo egitura guztia eutsiko du. Oin zelulatik zurtoina (*stalk*) eratzen eta hazten da polarki. Zurtoin honen muturra polarki hazteari utzi eta puzten hasten da isotropikoki, noranzko guztietan, 10 µm inguruko diametroa duen besikula (*vesicle*) izeneko egitura osatu arte. Honen goiko partetik metula (*metulae*) izeneko 60 bat apendizet sortzen dira eta hauetako bakoitzetik fialida (*phialide*) izeneko bi luzakin aterako dira. Azken hauek dira konidioak eratuko dituztenak. Fialida bakoitzak 100 konidio inguruko kate bana osatuko du, fialidako nukleoak egiten dituen beste hainbat mitosi prozesutan. Beraz, konidioforo bakoitzak 10000 konidio (nukleo bakarrekoak) baino gehiago izatera irits daiteke. Prozesu honek 15 orduko iraupena du gutxi gora-behera, horregatik kontsideratzen da *Aspergillus nidulans* onddoaren hazkuntza eta garapena denbora gutxian eragin daitekeela laborategian [6; 7; 8].



S2. Irudia: *Aspergillus nidulans* onddoaren konidioforoaren garapenaren pausoak SEM (*scanning electron microscopy*) bidez ateratako argazkiekin irudikatuta. Behean denbora eskala gehitzen da gutxi gora-beherako erreferentzia moduan. [8]. erreferentziatik lortua eta moldatua.

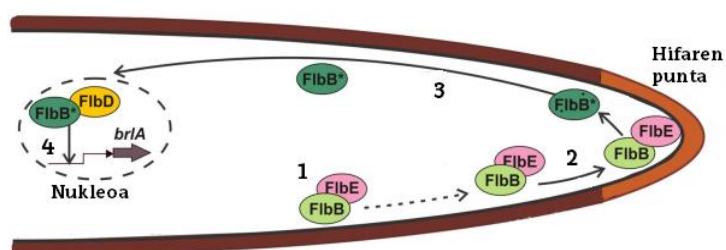
2.2. Kontrol genetikoa konidioforoen garapenean

Jakin bezala, gene bakoitzak karaktere bat definitzen duela esaten da, baina, berez, gene bakoitzak proteina bana sortzeko informazioa du. Gerora, sortutako proteina hori zelulan dagokion lekura edo lekuetara garraiatua izango da han bere funtzioa edo funtzioak betetzeko. *A. nidulans* onddoaren konidioforoen garapenaren kasuan, hainbat gene/proteinak hartzen du parte prozesuaren kontrol genetiko eta molekularrean.

Konidioforoak eta konidioak eratzeko beharrezkoak diren zelula moten sintesia erregulatzeko gaitasuna CDP (*central developmental pathway*) bide genetikoaren menpe dago [10]. Beste modu batean esanda, CDP bideak konidioforoen sintesirako beharrezkoak diren gene espezifikoaren espresioa aktibatzen du. CDP bidearen barruan badago funtzio zentrala jokatzeko duen gene bat, *brlA* izenekoak. Gene honek BrlA transkripzio-faktorea (TF, geneen promotoreetan, geneen hasieraren aurretik dagoen zatian alegia, DNA sekuentzia espezifikoak lotu eta RNAm-rako transkripzioa eragin edo inhibitu egiten duen proteina) kodetzen du, lehenengo CDP bezala ezagutzen dena. Honen funtzioa CDP bide zentralerako gainontzeko geneen espresioa erregulatzeko da [14]. Gainera, *brlA*-k botila-lepo bezala jokatzeko duen prozesuan, bere aktibazioa ezinbestekoa baita konidiaziorako, eta konidiazioa aktibatzen duten bide genetiko nagusiak *brlA*-ren promotorean (transkripzioaren hasiera kontrolatzen duen DNA sekuentzia) elkartzeko baitira. Beraz, CDP bidearen aktibazioa beharrezkoa da konidioak sortzeko.

brlA-ren espresioaren, eta ondorioz, CDP bidearen aktibazio hori, besteren artean, UDA (*upstream developmental activator*) bide genetikoak eragiten du [10]. Alegia, UDA bide genetikoak, zelula kanpoko eta barruko seinaleak (argia, elikagaien eskuragarritasuna, airea eta abar; [11]) kontutan hartuz, *brlA*-ren espresioa aktibatu ala ez erabakitzen duen bide genetiko bezala defini daitezke. UDA bidearen barruan, *brlA*-ren espresioa bere promotorera zuzenean lotuz kontrolatzen duten hainbat TF daude, FlbB, FlbC eta FlbD, hain zuzen.

GrAL hau burutu den laborategian urteak daramatzate ikerketa, besteren artean, FlbB TF-an zentratuz, hainbat arrazoi direla eta. Batetik, *brlA*-ren espresioa bere promotorean zuzenean lotuz kontrolatuta, konidiazioaren kontrolean funtzio garrantzitsua jokaten du. Eta bestetik, TF bat izanda eta transkripzioa nukleoan ematen den prozesua izanda (nukleoan dauden geneen espresioa kontrolatu behar baita), FlbB nukleoan kokatzeaz gain, hifen hazkuntza lekuan ere, puntan alegia, detektatzen delako. Gainera, puntako lokalizazioa deskribatu zaion TF fungiko ezagun bakarra da oraingoz, hifaren puntatik nukleora migratzeko gaitasuna izanik (ikus aurrerago) [11]. FlbB-ren lokalizazio hauek elkarrekiko menpekotasuna dute. Alegia, biak dira konidiazioaren kontrolerako beharrezkoak eta gainera, ordena jakin batean gertatu behar dira. Modu honetan, FlbB-ren dinamika hifetan hurrengoa da. Lehenengo, FlbB hifaren puntara garraiatzen da (mugimendu akropetala), FlbE-ren (UDA bideko beste elementu bat) laguntzaz. FlbB-k eta FlbE-k konplexu proteiko bat osatzen dute elkarrekin, ezinbestekoa dena garraio honetarako eta hifen puntan kokatzeko (ikus S3 irudia) [10; 12]. Puntako lokalizazio hau ez bada ematen, ez da konidiazioa aktibatzen; beraz, ezinbesteko lehen baldintzatzat har daiteke. Bigarrenik, FlbB FlbE-rengandik askatu eta gertueneko nukleoetara garraiatzen da (garraio basipetala) dineina motore molekularra beharrezkoa delarik [10]. Nukleoetan FlbB-ren metaketa FlbD-ren (UDA bideko beste TF bat) menpe dagoela ere deskribatu da. Noski, metaketa hau ere beharrezkoa da FlbB-k *brlA*-ren adierazpena aktiba dezan [10]. FlbB-ren lokalizazioa galtzen bada, konidioen sorrera prozesua ez da eragiten; hau da, FlbD eta FlbE-ren beharra dago FlbB-ren lokalizazio eta aktibitate egokia mantentzeko, bai hifen puntan eta baita nukleoan ere.

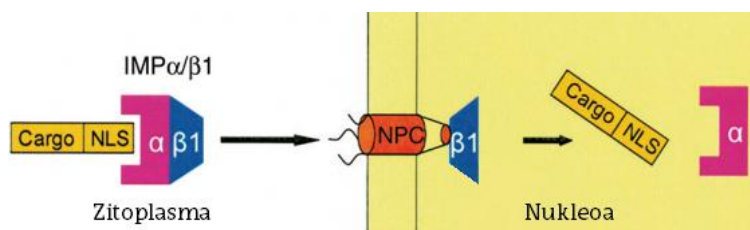


S3. Irudia: FlbB-ren dinamika hifetan zehar irudikatzen duen eredu sinplifikatua. 1) FlbB/FlbE konplexua. 2) Mugimendu akropetala. 3) Mugimendu basipetala. 4) FlbB/FlbD konplexuaren osaketa eta *brlA*-ren espresioaren kontrola. [15]. erreferentziatik lortua eta moldatua.

2.3. Garraio nukleo-zitoplasmatikoa eta bere parte-hartze hipotetikoa FlbB-ren metaketa nuklearrean

FlbB-k *brlA*-ren adierazpena aktiba dezan baldintza nagusienetako bat, beraz, nukleoan metatzea da. Orokorrean, proteina eta bestelako kargoen garraio nukleo-zitoplasmatikoa kargo horiek beraiek euren sekuentzia peptidikoetan izaten dituzten NLS (*nuclear localization signal*; nukleoranzko garraioa, inportazioa) edo NES (*nuclear export signal*; zitoplasmaranzko garraioa, esportazioa) seinaleen bidez burutzen da. NLS eta NES seinale hauek karioferina izeneko proteinek ezagutu eta lotzen dituzte. Karioferina hauek dira, besteren artean, garraiolari lanak beteko dituztenak, batzuk inportina (nukleoranzko garraioa; NLS-ak ezagutzen dituzte) eta beste batzuk esportina (zitoplasmaranzko garraioa; NES-ak ezagutzen dituzte) bezala jokatzuz (ikus S4 irudia) [13].

FlbB-k badu bere sekuentzian NLS seinale bat, nukleoan metatzeko beharrezkoa dena [11]. NLS hori α -inportinak ezagutzen dituen seinaleetako baten oso antzekoa da, NLS klasikoaren artean bipartita bezala ezagutzen dena, lisina (Lys, K) eta arginina (Arg, R) aminoazidoen eraketako bi zatitako seinalea baita (57-**KKTTRDGQPAKRRG**-70). α -inportinak kargoaren NLS-a irakurri eta lotu egiten du. Bestetik, α -inportinak β -inportinarekin interakzionatzen du IBB (*importin-beta binding*) eremua erabiliz, inportina- α/β heterodimeroa osatuz. β -inportina da garraio nukleo-zitoplasmatikoa burutuko duena, poro nuklearreko konplexuarekin interakzionatuz (NPC, *nuclear pore complex*) (ikus S4 irudia) [13]. Behin nukleo barruan, heterodimeroak kargoa askatuko du eta zitoplasmara itzultzen da beste kargo batekin prozesua errepikatzeko.



S4. Irudia: Kargo proteinaren inportazio nuklearra inportina- α/β heterodimeroaren bitartez. Kontrako prozesua, nukleotik zitoplasmarako

garraioa, alegia, esportazioa litzateke, esportinen esku egongo litzatekeena, NES seinaleen bidez. [9]. erreferentziatik lortua eta moldatua.

A. *nidulans* onddoaren kasuan α - eta β -inportinen homologoak KapA eta KapB bezala ezagutzen dira, hurrenez hurren. Bi karioferina hauek nukleo inguruetan lokalizatzeaz gain, zitoplasman zehar elkarrekin hifen puntetara edo hifen puntetatik atzerantz mugitu daitezkeela deskribatu da [13]. Noranzko biko garraio honek tubulinazko zitoeskeletoaren beharra du, mikrotubulu izeneko zuntzek eta hauen gainetik kargoak mugituz lan egiten duten kinesinak (puntaranzko garraioa burutzen dute) eta dineina/dinaktina (puntatik atzeranzko garraioa burutzen dute) motor molekularrek osatzen dutena [13]. Pentsa liteke KapA eta KapB karioferinek hifatan distantzia luze hauek kargoren baten edo batzuen garraiorako burutzen dituztela, zelula begetatibo sinzitialeko nukleo guztietara inportazioa ahalbidetuz. Zoritxarrez, ustezko kargo horiek zeintzuk izan daitezkeen ezezaguna da oraindik.

Hau guztia kontutan hartuz, FlbB-ren puntatik nukleorako garraioa eta metaketa nuklearra inportina hauen menpe egon litekeen ala ez aztertu nahi izan da GrAL honetan. Horretarako, abiapuntu gisa α -inportinaren bi mutante termosentikor erabili dira (ikus Helburuak).

2.4. Helburuak

Harrerako laborategiko dinamika jarraituz eta prozedura esperimental zein konputazionalen bidez, honako helburuak proposatu dira:

1. α -inportinaren mutante termosentikor biren ezaugarritze fenotipikoa egitea. Mutante hauek Eduardo A. Espeso ikertzaileak isolatu zituen CIB-CSIC ikerketa zentroko bere laborategian. Termosentikor adierarekin, temperatura batean (30 °C) funtzional, baina bestean (37 °C) funtzional ez diren KapA-ren forma mutanteak adierazten dituzten anduiak direla esan nahi da.
2. Fenotipo termosentikor horiek eragiten dituzten *kapA* genearen, eta ondorioz, KapA proteinaren, mutazioak zeintzuk diren identifikatzea eta horiek proteinaren egitura eta funtzioan izan dezaketen eragina auresatea.
3. FlbB eta KapA-ren arteko harreman hipotetikoa aztertzea, aurretik aipatutako KapA-ren mutazio horiek, temperatura errestriktiboan, FlbB lokalizazio subzelularra aldatu edo galdu arazten duten ala ez behatuz.

Helburu horiekin, bestetik, biologia zelular eta molekularreko hainbat teknika genomikoren oinarriak ezagutzeko aukera eduki da; ezaugarritze genotipikoak, DNA erauzketak, PCR erreakzioak, zelulen transformazioa, DNA sekuentziazioak eta analisi bioinformatikoak, besteak beste, hau delarik lan honen bigarren mailako helburu orokorra. Era berean, testu zientifikoaren idazketarako eta aurkezpenerako gaitasunak ere garatu dira.

3. Materialak eta metodoak

3.1. Kultura baldintzak eta medioak

Hurrengo tauletan, *Aspergillus nidulans* onddoa hazteko erabili diren kultura medioen, gehigarrien eta elikagaien disoluzioen prestaketak eta konposaketa jasotzen dira. Oro har, disoluzioak miliQ erako ura erabiliz arrasean jarri eta autoklabean esterilizatu dira 110 °C-tan 20 minutuz.

M1. Taula: *A. nidulans* onddoa hazteko kultura medioak eta hauen prestaketa.

Kultura medioak	Prestaketa (1 L-ko)
<i>Aspergillus</i> -en medio minimo solidoa (MMA (s))	- 20 mL gatz eta traza elementuen disoluzioa - 15 g agar - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
<i>Aspergillus</i> -en medio minimo likidoa (MMA (l))	- 20 mL gatz eta traza elementuen disoluzioa - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
Birsortze medioa (MMR)	- 20 mL gatz eta traza elementuen disoluzioa - 342 g sakarosa (1M bukaerako kontzentrazioa) - 15 g agar - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
Birsortze TOP medioa (MMR-TOP)	- 20 mL gatz eta traza elementuen disoluzioa - 342 g sakarosa (1M bukaerako kontzentrazioa) - 6 g agar - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
Medio osatu likidoa (MCA (l))	- 20 mL gatz eta traza elementuen

	<p>disoluzioa</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5 g legamia estraktua - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
--	--

M2. Taula: *A. nidulans* onddoa hazteko kultura medioen gehigarriak eta hauen prestaketa.

Kultura medioentzat gehigarriak	Prestaketa (1 L-ko)
<p>Traza elementuen disoluzioa (1000x) (4 °C-tan gorde argitik babestuta)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 22 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 11 g H_3BO_3 - 5 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 5g $FeSO_4 \cdot 2H_2O$ - 1,6 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 1,6 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1,1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 50g Na_2EDTA - Doitu pH-a 6,8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioaz
<p>Gatz eta traza elementuen disoluzioa (50x)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 26 g KCl - 26 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 76 g KH_2PO_4 - 50 mL traza elementuen (1000x) disoluzioa
<p>Glukosa disoluzioa % 20 (10x)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 200g glukosa
<p>Amonio tartrato disoluzioa, 0,5 M (100x)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 92g amonio tartrato
<p>Sodio dihidrogenofosfato disoluzioa, 0,5 M</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 60 g NaH_2PO_4

M3. Taula: Hazkuntza medioetarako beharrezko izan diren elikagai osagarriak.

Hazkuntzarako beharrezko elikagaiak	Prestaketa (100 mL-ko)
Biotina disoluzioa (10000x stock-a) (4 °C-tan gorde)	- 10 mg biotina
Piridoxina disoluzioa (1000x) (4 °C-tan gorde)	- 50 mg piridoxina
Inositol disoluzioa (100x) (4 °C-tan gorde)	- 120 mg inositola
Uraziloa (s)	- 0,056 g kultura medioaren 100 mL-ko
Uridina (s)	- 0,122 g kultura medioaren 100 mL-ko

3.2. Erabilitako anduiak eta oligonukleotidoak

Ondorengo taulan, GrAL honetan zehar erabilitako *Aspergillus nidulans* onddoaren anduiak eta horien genotipoak laburbiltzen dira. Era berean, GrAL honetan erabilitako oligonukleotidoak M5 taulan jasotzen dira.

M4. Taula: Lan honetan erabili diren *A. nidulans* onddoaren anduiak.

Anduiak	Genotipoa
MAD1425 (WT)	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>
BD1353 (I22 mutantea)	<i>pyrG8; pyroA4, ΔnkuA::bar; kapA^{I22*}::gfp::pyrG; veA1</i>
BD1354 (K23 mutantea)	<i>pyrG89; pyroA4, ΔnkuA::bar; kapA^{K23*}::gfp::pyrG; veA1</i>
BD185	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB, gfp::flbB; veA1</i>
BD279	<i>pyrG89; wA4; inoB2, hhoA::mCh::pyroA; (myc)3-PacC(PacC900); kapA::gfp::pyrG; veA1</i>

* Ikus testu nagusia I22 edo K23 mutazioak zeintzuk diren jakiteko.

M5. Taula: Lan honetan erabili diren oligonukleotidoak.

Oligonukleotidoak	Sekuentzia (5' → 3')
Imp2	CATATCCATGGAATCGCCGCCATTGGCACC
Imp3	GAAAGCCAGAATCAAAAGCTTAAATGAAGG
Imp4	ACACAGACTAAGTCCGATGAGAGGATTGGC
Imp5	CAATAGGCTTCTCTTCGAGCTAGCAACTGC
Imp9	TTTGCCTGGTTCATTTCGACACCATGTCCG
Imp GFP1	GGTGCCAATGGCGGCGATTCCATGGATATGGGAGCTGGTG CAGGCGCTGGAGCC
Imp GFP2	CCTTCATTTAAGCTTTTGATTCTGGCTTTCGTCTGAGAGG AGGCACTGATGCG

3.3. Teknika esperimentalak

3.3.1. Ezaugarritze fenotipikoak

Erabilitako andui mutanteen (I22 eta K23) ezaugarritze fenotipikoa egiteko MMA mediodun Petri plakak prestatu dira, M1, M2 eta M3 taulako disoluzioak erabiliz eta M4 taulako anduiak inokulatuz. Lehenik, andui bakoitzaren esporak lortu dira, anduiok 30 °C-tan inkubatuz. Bertatik, anduiak MMA-dun plaka berrietara transferitu dira egurrezko txotxen laguntzaz inokulazioa puntuala eginez Petri plaken erdigunean. Fenotipoen analisia egiteko, berriz, MMA, NaH₂PO₄ (0,5 M) disoluziodun MMA eta MMR medioak erabili dira. I22 eta K23 fenotipoetan tenperaturak duen garrantzia dela eta, inkubazioak bai 30 °C baita 37 °C-tan ere burutu dira. Inokulazioak Bunsen metxeroa alboan edukiz egin dira, mikroorganismo arrotzen kontaminazioa ekiditeko. Fenotipoak inokulaziotik 72 ordura aztertu eta erregistratu dira argazkiak ateraz.

3.3.2. DNA genomikoaren erauzketa

Lehenik, anduiak Petri plakatan hazi eta konidioak jaso dira 15 mL-ko polipropilenoazko FalconTM hodian, Tween 20 detergentetan (Across Organics) %0,02 den disoluzioaren 4 mL-tan. Lagin bakoitzeko konidioak Vortex irabiatzaileaz ahalik eta gehien banatu eta beharrezko elikagaiak dituen

kultura medio likidoan inokulatu dira, 100 mL-ko erlenmeyer matrizeetan. Giro-tenperaturan eta 24 orduz inkubatu dira, agitazioarekin.

Denbora hau pasata, *Miracloth* papera erabiliz mizelioak filtratu eta hauekin 2 mL-ko *Eppendorf*TM hodiak erdiraino bete dira, denbora oroz izotzetan mantenduz. Mizelio laginak 24 orduz liofilizatu dira. Prozesua amaitzean, agregatuak ez sortzeko, eta batez ere zelulak lisatzen hasteko, mizelio laginak *Bullet Blender (Next Advance)* xehagailuarekin homogenizatu dira, minutu batez eta hodietan aurrez metalezko bolatxoak gehituz.

Homogenizatutako mizelio laginak, 1 mL TSE disoluzioan (25 mM tris-HCl (pH=8) + 0,25 M sakarosa + 20 mM EDTA) birsuspenditu eta SDS disoluzioaren (% 10) 100 µL gehitu dira lagineko (mintzak desegituratzeko), gerora 15 minutuz 65 °C-tan berotu direlarik. Ondoren, metalezko bolatxoak berreskuratu eta hodi berrietan mizelio laginen fenolizazio prozesua burutu da, fenol/kloroformo/alkohol isoamiliko (50:48:2 proportzioan, *Panreac*) disoluzioaren fase organikoaren (behekoa, fenola) 1 mL gehituz. Eskuz 10 minutuz irabiatu ondoren, laginak 5 minutuz zentrifugatu dira abiadura maximoan (14000 rpm) eta giro-tenperaturan. Goiko fasea jaso (kontu handiz mizelio arrastorik ez hartzeko) eta fenolizazio prozesua errepikatu da, baldintza beretan.

Jasotako lagin bakoitzari bere bolumenaren hamarrena gehitu zaio sodio azetatotan 3M den disoluziotik eta bolumenaren sei hamarren isopropanol. Inbertsio bidez nahastu eta giro tenperaturan 15 minutuz pausatu dira hodiak, DNA prezipitatzen utziz. Hauek zentrifugatu egin dira 5 minutuz, giro-tenperatura eta 14000 rpm-tan eta bi fase bereizi direla konprobatu da.

Likidoa hutsune bidez xurgatu da (kontu handiz prezipitatua ez kaltetzeko) eta DNA prezipitatua etanolean % 80 den disoluzioaren 1 mL bidez garbitu egin da. Prozesua bigarren aldiz errepikatu da. Ondoren, DNA prezipitatua miliQ uraren 300 µL-tan disolbatu eta RNAsa disoluzioaren (5 mg/mL, *Thermo Fisher*) 3 µL gehitu dira lagin bakoitzeko (RNA degradatzeko eta honen kontaminazioa ekiditeko), hatzekin nahastuz. Laginak 65 °C-tan inkubatu dira ordubetez. Amaitzeko, berriz ere sodio azetato eta isopropanola gehitu zaizkie laginei (aurreko diluzioak) DNA hauspearazteko. DNA lagin hauek pipeta punta batekin jaso eta bakoitza etanolean % 80 den disoluzioaren 500 µL dituen hodi banatara transferitu da. Laginak zentrifugatu

dira 5 minutuz, giro-tenperatura eta 14000 rpm-tan. Gaineko likidoa xurgatu eta miliQ uraren 200 μ L-tan disolbatu da DNA lagin bakoitza.

3.3.2. DNA laginen analisisa agarosa elektroforesi bidez

Laginen integritatea, tamaina eta gutxi gorabeherako kontzentrazioa agarosa elektroforesi bidez baieztatu da. Agarosatan % 0,8 den gela erabili da elektroforesia egiteko. Laginak prestatzeko momentuan, 2 μ L TAE 1x (40 mM trizma basea + 20 mM azido azetikoa + 1 mM EDTA), tindatzailearen 1 μ L (glizerola, bromofenol urdina eta xilen zianola dituen) eta azkenik DNA disoluzioaren 5 μ L gehitu dira. Tamainaren markatzaile bezala, λ bakteriofagoaren DNA fragmentatua erabili da (2,5 μ L nahastu dira goian aipatutako tindatzaile eta TAE bolumenekin). Markatzaileak (*Thermo Fisher*) gure DNA laginen gutxi gora-beherako tamaina zein den jakiteko erreferentzia bat emango digu, fragmentatua egotean tamaina ezaguneko banda desberdinak emango baititu (ikus Emaitzak). Nahasteak mikropipetaz jaso eta gelaren kale desberdinetan kargatu dira. Elektroforesia 40 minutuz luzatu da (100 Voltiotan), ondoren etidio bromurotan tindatu delarik gela ordu erdiz (etidio bromuroa DNA molekulekin lotu eta hauei fluoreszentsia emango die) eta *BioRad* enpresaren *ChemiDocTM MP system* makina bidez aztertu delarik emaitza.

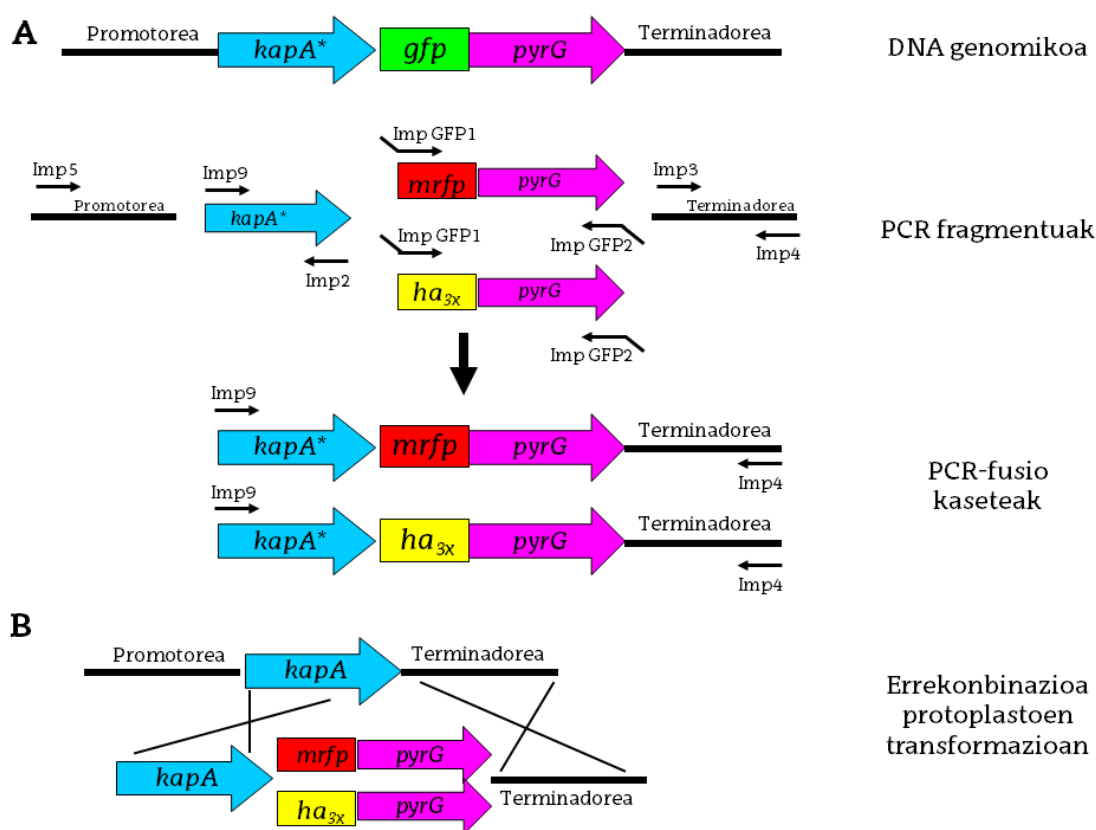
3.3.3. Andui basati eta mutanteen *kapA* genearen sekuentziazioa

Aipatu bezala, I22 eta K23 anduiek *kapA* genean mutazioak dituzte, hau da, gene hau osatzen duen nukleotido sekuentzian hainbat motakoak izan daitezkeen aldaketak agertzen dira. Aldaketa hauek Sanger sekuentziazioa izena duen prozesuaren bidez identifikatzen dira, nukleotidoen ordena determinatuz. Prozesu hau Madrileko *SecuGen* enpresari esker bideratu da, DNA genomiko bakoitzetik abiatuta *kapA* genea anplifikatuz PCR bidez (Imp9 eta Imp2 oligonukleotidoak erabiliz; ikus M1 irudia) eta beraiei bidaliz sekuentziazioa egin dezaten. Emaitzen azterketa elektroferograma izeneko grafikoei esker egiten da, egon daitezkeen mutazioak sekuentzia basatiarekiko konparaketa bidez determinatzen direlarik (ikus aurrerago). Beraz, sekuentziazioari esker nukleotido ordena zehaztu, nukleotido horiek

kodezen dituzten aminoazidoak ezagutu eta azken hauek (bai forma basatiak bai forma mutanteek) osatzen duten proteinaren egitura aurrean daiteke (ikus 3.4 sekzioa; ikus ere Emaitzak).

3.3.4. A. *nidulans*-en transformaziorako DNA kasete sintetikoaren sintesia PCR bidez

Funtsean, PCR (*polymerase chain reaction*) erreakzioak DNA zati zehatz baten milioika kopia (anplifikazioa) egitean datza. Fusio-PCR erreakzioak, baina, konstrukzio genetiko berriak egitean datza, aurretik amplifikatutako fragmentuak nahieran lotuz eta konbinatuz. Horretarako, PCR erreakzioen lehen txanda batean, lotu nahi diren fragmentuak amplifikatzen dira, independienteki, eta bigarren txanda batean, fusio-PCR erreakzioan alegia, lotu egiten dira beharrezkoa den ordenean (ikus M1 irudia).



M1. Irudia: PCR erreakzioen estrategia transformaziorako kaseteak ekoizteko. **A)** Lehenik, DNA genomikoaren intereseko zatia amplifikatu da (*kapA** genea duena zehazki, bai alelo basatia, baita forma mutanteak ere, hurrenez hurren; Imp9 eta Imp2 oligonukleotidoak erabili dira). Honekin batera, mRFP::pyrG

edo HA_{3x}::*pyrG* zatiak anplifikatu dira, bakoitza DNA plasmidiko egokitik eta ImpGFP1 eta ImpGFP2 oligonukleotido pareak erabiliz. Hirugarrenik, *kapA* genearen ondoren dagoen eremuaren (terminadorea; 3'-UTR eremua) 1500 nukleotido inguru anplifikatu dira DNA genomikoa eta Imp3 eta Imp4 oligonukleotidoak erabiliz. Behin hiru fragmentu mota hauek anplifikatuta (gogoratu *kapA* genearen 3 aldaera egongo direla, eta erdiko fragmentuaren bi aldaera), fusio-PCR bidez kaseteak eraiki dira (guztira 6 fusio kasete, 3 mRFP etiketadunak eta beste hiru HA_{3x} etiketadunak; *kapA*-ren aldaera basatia eta I22 edo K23 forma mutanteak dituztenak). B) *A. nidulans*-en protoplastoen transformazioa egiterakoan, errekonbinaketa homologoaz, fusio-PCR kaseteek *kapA* gene basatia ordezkatzeko dute.

Emaitzen atalean azalduko den bezala, irudian azaldutako prozedura abiatzeko, *kapA**::*gfp*::*pyrG* kimerak (I22 edo K23 aldaera mutanteak) adierazten dituzten anduien DNA genomikoa erabili da. Andui hauen eta andui basati baten DNA genomiko horiek molde bezala erabilia (3 molde desberdin, beraz), *kapA*-ren sekuentzia anplifikatu da batetik (hiru erreakzio beraz), *mrfp*::*pyrG* (mRFP proteina fluoreszente gorria kodetzen duena; plasmido batetik anplifikatua) edo *ha*_{3x}::*pyrG* (HA_{3x} etiketa kodetzen duena; beste plasmido batetik anplifikatua), eta *kapA*-ren terminadorearekin batera (azken hau *A. nidulans*-en andui basati baten DNA genomikotik anplifikatu da). Behin zati guztiak anplifikatuta, M1 irudian jaso bezala fusionatu dira. Azpimarratu behar da guztira sei fusio-PCR erreakzio burutu direla, *kapA*-ren aldaera basatia, eta I22 edo K23 aldaera mutanteak erabilia, eta bakoitza mRFP edo HA_{3x} etiketa adierazteko. Fragmentu eta fusio-kaseteen purifikazioa *Macherey-Nagel* enpresaren *Nucleospin* kit-a erabiliz eta euren protokoloa jarraituz egin da.

PCR-a burutzeko gailuan, termozikladorean, alegia, erabilitako baldintzak (denborak eta osagaien bolumenak) M6 taulan jasotzen dira. Funtsean, DNA polimerasa izeneko entzima erabilia, eta hiru pausotako etapak errepikatuta, aurretik azaldutako DNA zatiak eta fusio kaseteak sortuko dira. Etapa bakoitzean errepikatzen diren hiru pauso horiek DNA-aren desnaturalizazioa, hibridazioa eta elongazioa faseak dira.

M6. Taula: PCR erreakzioak egiteko diseinatutako baldintzak. Orokorrean, molde DNA-ren edo DNA-en bolumenak 1-3 μL dira (*), kasuan-kasu, eta elongazioaren denbora anplifikatu nahi den DNA zatiaren edo fusioaren arabera aldatzen da, kilo-base bakoitzeko minutu bat gehituz (**).

Erreaktiboak	V (μL)	T ($^{\circ}\text{C}$)	t
DNA	(*)	98	30''
Oligonukleotido bakoitza	1,5	98	10''
dNTP	4	57	10''
Buffer	10	Soilik fusioan	
Phus. Pol.	0,5	72	(**)
m qH_2O	50 arte	72	7'
		12	∞

x25

3.3.5. Protoplastoen lorpena eta transformazioa

Protoplastoak pareta zelularrik gabeko zelulak dira, zeintzuek, baldintza oso espezifikotan, PCR bidez sortutako DNA sintetikoa (ikus aurreko sekzioa) barneratu eta euren genomari integratzeko gaitasuna duten. Beraz, lehenik protoplastoak lortu egin behar dira eta gero hauek sortutako DNA sintetikoarekin (fusio-PCR bidez lortutako kaseteak, alegia) transformatu. Handik denbora batera, eta baldintza selektiboetan (ikus aurrerago), kasete sintetiko horiek genomari integratu dituzten andui transformanteak isolatuko dira. Hurrengo taulan, prozedura honetan erabili diren disoluzioak eta horien prestaketa nola egin laburbildu dira. Oro har, disoluzioak miliQ ura erabiliz arrasean jarri eta autoklabean esterilizatu dira 110 $^{\circ}\text{C}$ -tan 20 minutuz (KCl + azido zitriko disoluzioa filtrazioz esterilizatu da).

M7. Taula: Protoplastoen lorpen eta transformazio prozesuan erabilitako disoluzioak.

Disoluzioak	Prestaketa (100 mL-ko)
KCl + Azido zitrikoa (4 $^{\circ}\text{C}$ -tan gorde)	- 8,2 g KCl - 2,1 g azido zitriko monohidratatua - Doitu pH-a 5,5-ra KOH-tan 1,1M den disoluzioaz

<i>Protoplasting solution</i> (16 mL) (Momentuan prestatu eta 4 °C-tan gorde)	- 2,048 g <i>Vinotaste</i> entzima (<i>Novozymes</i>) - 16 mL KCl + Azido zitriko disoluzioa
0,6 M KCl	- 4,47 g KCl
0,6 M KCl + 50 mM CaCl ₂	- 4,47 g KCl - 0,74 g CaCl ₂ monohidratatua
7 soluzioa	- 18,22 g sorbitol - 1 mL TrisHCl (1M, pH=7,5) - 1 mL CaCl ₂ (1M)
8 soluzioa	- 30g polietilenglikola (PEG6000; Sigma) - 0,5 mL TrisHCL (1M, pH=7,5) - 0,5 mL CaCl ₂ (1M)
Sakarasadun disoluzioa (4 °C-tan gorde)	- 41,08 g sakarosa

Transformatu nahi den anduiak (BD185) GFP::*FlbB* kimera adierazten du [16]. Era honetan, *KapA*-ren I22 edo K23 bertsio mutanteak bere genomatik integratzean, mutazio horiek *FlbB*-ren lokalizazioarengan duten eragina aztertu ahal izango da (ikus Sarrera; ikus ere Helburuak).

Protoplastoen lorpenerako, lehenik, transformatu beharreko anduiaren konidioak tween 20-tan % 0,02 den disoluzioan jaso ($2,5 \times 10^6$ konidio/mL) eta beharrezko elikagaiak dituen MCA hazkuntza medioaren 150 mL-tan inokulatu dira, 500 mL-ko erlenmeyer matrax batean. Lagina 14 orduz eta 30 °C-tan hazi da, 150 rpm-ko agitazioaz. Onddo hazi eta mizelioa *Miracloth*TM paper esteril bidez filtratu da. Handik 1,25 g-ko alikuota bat jaso eta beharrezko elikagaiak dituen 16 mL MCA likido + 16 mL *Protoplasting solution* nahastean erresuspenditu da, 100 mL-ko erlenmeyer matraxe batean. *Vinotaste* entzimen nahasteak ondo zelulen pareta zelularra liseritzen du. Horretarako, prestatutako nahastea 90-120 minutuz inkubatu da 30 °C-tan eta 100 rpm-ko agitazioz. Protoplastoen ekoizpenaren jarraipena egiteko, 60. minututik aurrera eta 15 minuturo, alikuotak hartu eta hauek mikroskopia bidez behatu dira.

Protoplastoak lortu ondoren, hauen garbiketa egin da. Horretarako, lehenik, liseriketa nahastea sakarosatan 1,2 M den disoluzio baten 16 mL zituen 50 mL-ko polipropilenoazko bi hodietan banatu eta hodi hauek 4 °C-tan zentrifugatu dira 10 minutuz eta 1800 g-tan. Protoplastoek geruza bat osatzen dute interfasean eta hau Pasteur pipeta bidez jaso da.

Bigarrenik, protoplasto disoluzio totalaren bolumenarekiko bikoitza den KCl (0,6 M) disoluzioa gehitu zaio eta berriz ere zentrifugatu dira hodiak 4 °C-tan, 10 minutuz eta 1800 g-tan. Oraingoan, protoplastoak hodiaren behealdean prezipitatu dira *pellet* moduan. Beraz, gaineko likidoa kendu eta *pellet*-a garbitu da, KCl-tan 0,6 M den disoluzioaren 2 mL-tan birsuspendituz, 1,5 mL-ko bi hoditan banatuz eta zentrifugatuz giro-tenperaturan, 3 minutuz 2400 g-tan. Garbiketa prozesua errepikatu da eta prezipitatutako frakzioak jaso dira KCl-tan 0,6 M eta CaCl₂-tan 50 mM den disoluzio baten 1 mL-tan. Azken pauso hau behin errepikatu da. Honekin protoplastoen lorpen prozesua amaitutzat ematen da.

Transformazioa egiteko burutu nahi den transformazio adina polipropilenoazko hodi (50 mL-ko *Falcon*TM hodiak) prestatu dira. Bakoitzari, 100 µL protoplasto nahaste eta 5-10 µL DNA kasete (hodi bakoitzean dagokion kasetea; hodietako batean DNA kasetarik ez dago, hodi honetatik ezingo litzateke transformanterik lortu, eta horregatik prozesuaren kontrol negatibo moduan erabiliko da) gehitu zaizkio. Nahastea *Vortex* bidez irabiatu da, 6-8 aldiz, abiadura maximoan eta, ondoren, PEG disoluzioaren (8. soluzioa) 50 µL gehitu dira. Berriz ere 4-5 aldiz irabiatu da *Vortex* bidez segundo bakarreko txandetan. Nahasteak 25 minutuz pausatu dira 0 °C-tan. Ondoren 8. soluzioaren 1 mL gehitu eta hatz bidez nahastu da poliki, berriz ere nahasteak 5 minutuz giro tenperaturan pausatuz. Jarraian 7. soluzioaren 5 mL eta MMR-TOP medioaren 15 mL (aurrez urtua eta 40 °C-tan egon behar da) gehitu dira transformazio plakak nahastearekin inokulatu ahal izateko.

Transformazio plaka hauek aurretik prestatu dira MMR medioarekin. Kontutan izan behar da, sortutako fusio kaseteek *pyrG* genearen bertsio basatia daramatela. Transformatu den anduiak, aldiz, *pyrG* genea mutatu du. Horrek esan nahi du ezin dituela bere kabuz uridina eta urazilo konposatuak ekoiztu, azido nukleikoen sintesirako ezinbesteko direnak.

Transformatu beharreko anduia hazteko, beti gehitu behar dira uridina eta uraziloa hazkuntza medioan, esan bezala, andui horrek ezin dituelako bere kabuz sortu.

Fusio-PCR kaseteak transformazioaren ondoren andui honen genomatik integratzen direnean, aldi berean, *pyrG* genearen alelo basatia jasotzen dute, eta ondorioz, uridina eta uraziloa ekoizteko gaitasuna eskuratzen dute. Hau izango da transformanteen selekzioarako erabiliko den irizpide nagusia, transformanteak uridina eta urazilo gabeko medioan (medio selektiboa deritzona) haztea, alegia, fusio kaseteak jaso dituzten koloniak haziko baitira bakarrik. MMR selektibodun plakekin batera, MMR ez-selektibodun plaka bana ere prestatu da transformazio nahaste bakoitzeko. Azken hauek kontrol moduan erabiltzen dira, bertan uridina eta uraziloa ere gehitu direnez, transformatutako eta transformatu ez diren protoplastoak, denak alegia, hazi beharko lirатеkeelako. Horrela, kontrol plaka hauetan, protoplasto guztiak haziko lirатеke.

Transformazio nahasteekin inokulatutako plakak 37 °C-tan inkubatu dira 48-72 orduz. Inkubazioa amaitzean, transformanteak MMA medio selektibodun plaketara transferitu dira.

3.4. Azterketa bioinformatikoa

kapA genearen I22 edo K23 alelo mutanteak sekuentziatu ondoren (ikus 3.3.3 sekzioa), euren mutazioak identifikatu dira (ikus Emaitzak). Horretarako, nukleotido sekuentzien elektroferograma artxiboak *Chromas Lite* programarekin zabaldu eta sekuentzia basatiarekin konparatu dira *ExpASy Bioinformatics Resource Portal* web orrialdearen (Artimo, P. et al., 2012; https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) *LaLign* zerbitzuari esker. Konparaketa honetan I22 edo K23-ren sekuentziek erreferentzia basatiarekiko (wild-type) dituzten aldaketak detekta daitezke. Sekuentziazio hauetan, I22 mutantearen sekuentzia guztia aztertu ahal izan da eta K23 aleloaren % 90-a.

Erreferentzia basati hau *FungiDB* (Stajich, J.E. et al., 2012; <https://fungidb.org/>) eta *AspGD* (Arnaud, M.B. et al.; <http://www.aspergillusgenome.org/>) datu baseei esker lortu da (AN2142 bezala

ezagutzen da *kapA*). Datu base hauekin *kapA* genearen antolamendua ulertu da; 1942 nukleotido ditu hiru exoi eta bi introietan antolatuta. Bi mutanteen nukleotido sekuentziak aztertu ondoren hauek kodifikatzen dituzten aminoazido kateak eraiki dira. Introiek ez dute aminoazidorik kodifikatzen, ondorioz 553 aminoazidoko katea izango da KapA-rena. Beraz, erreferentzia basatiaren kate peptidikoarekin alderatuta mutazioak identifikatu dira.

Sekuentzia hauekin proteinaren egitura hiru dimentsionalaren ereduak irudikatzeko bi zerbitzu bioinformatiko erabili dira, alde batetik *Swiss Institute of Bioinformatics* institutuak eskeintzen duen *Swiss-Model* (Waterhouse, A. et al., 2018; <https://swissmodel.expasy.org/>) eta bestetik, *Structural Bioinformatics Group of Imperial College London* taldeak garatu duen *Phyre2* programa (Kelley, L.A. et al., 2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>). Azkenik, *Swiss-Model* orrialdeak proposatutako egitura *Dynamut* programa erabiliz (Rodrigues, C.H.M. et al., 2018; <http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut/>) mutazio espezifikoek egituran eta konformazioan zer nolako eragina izan dezaketen aztertu da. Europako bioinformatika institutuak (*EMBL-EBI*) eskeintzen duen *InterPro* datu baseari esker (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) KapA proteina osatzen duten eremu eta egitura sekundarioen detaileak aztertu dira.

4. Emaitzak

Atal honetan, abiapuntua izan diren bi mutante termosentikorren analisi desberdinak burutu dira, ezaugarritze fenotipikoak, euren mutazioen identifikazioa eta mutazioen azterketa bioinformatikoa, alegia. Azkenik, andui errekonbinanteak sortu dira, hasieran planteatutako fluoreszentzia mikroskopiako analisiak burutzeko aukerarik izan ez den arren.

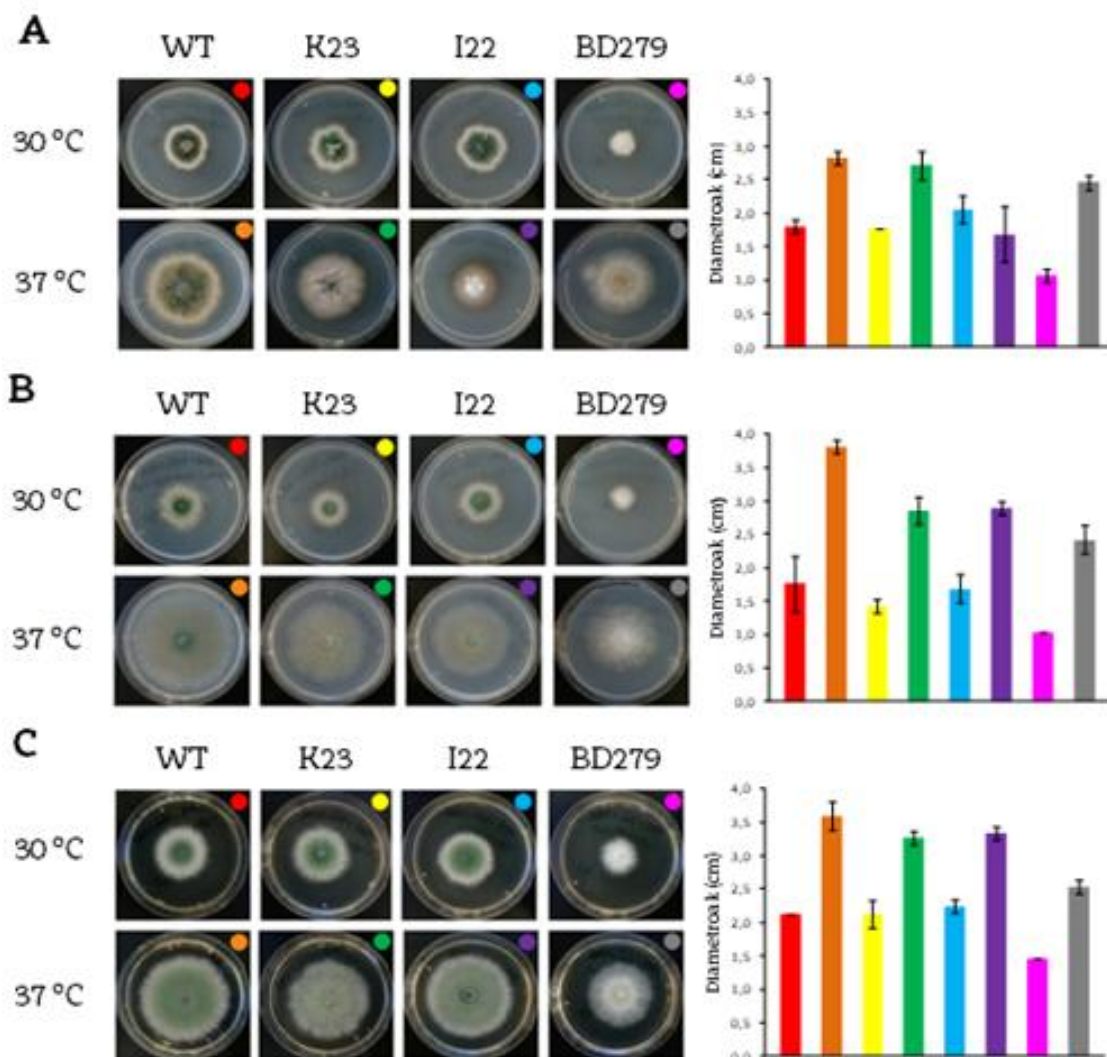
4.1. Mutante termosentikorren ezaugarritze fenotipikoa

KapA::GFP-ren bertsio termosentikorra adierazten duten I22 eta K23 andui mutanteak Eduardo A. Espeso ikertzaileak isolatu zituen bere laborategian. Horretarako, fusio-PCR bidez *kapA::gfp::pyrG* kasetea sortu zuen baina, PCRa egiterako garaian baldintza suboptimoak erabili zituen DNA polimerasak, ausaz, *kapA* genean mutazioak sar zitzan. Zegokion anduia transformatuta, 30 °C-tan konidiatzen, baina 37 °C-tan akonidialak ziren anduiak isolatu zituen, horien artean I22 eta K23 mutanteak.

Anduiak harrera laborategian jaso bezain laster, lehenik, euren ezaugarritze fenotipikoa burutu da, bakoitzak erakusten duen hazkuntza (koloniaren erradioa) eta garapen patroia (espora asexualen sintesia ala ez) tenperatura permisibo (30 °C; mutazioek ustez ez dute eraginik KapA-ren aktibitatean) eta errestriktiboan (37 °C; mutazioek KapA-ren funtzio galera eragiten dute) ezagutu ahal izateko kultura medio desberdinetan.

Horretarako, erreferentziazko bi andui erabili dira I22 eta K23 mutante termosentikorrekin batera (ikus E1 Irudia). Batetik, konidio berdedun andui basatia (WT) eta bestetik, KapA::GFP kimera basatia adierazten zuen konidio zuridun BD279 anduia. Gogoratu behar da I22-k eta K23-k mutazio desberdinak dituzten KapA*::GFP-ren bertsioak adierazten dituztela. Lau andui horien fenotipoak 1) MMA kultura medio estandarrean, 2) NaH₂PO₄ (0.5M) duen MMA medioan eta 3) sakarosa (1M) duen MMA medioan aztertu ziren, esan bezala, 30 °C eta 37 °C-tara, eta inokulaziotik 72 ordura. Fosfatoa edo sakarosa estres abiotikoaren eragile bezala gehitu dira, ikusi baita hainbat

fenotipo akonidial itzularazteko eta konidiante bihurtzeko gaitasuna dutela [10; 12].



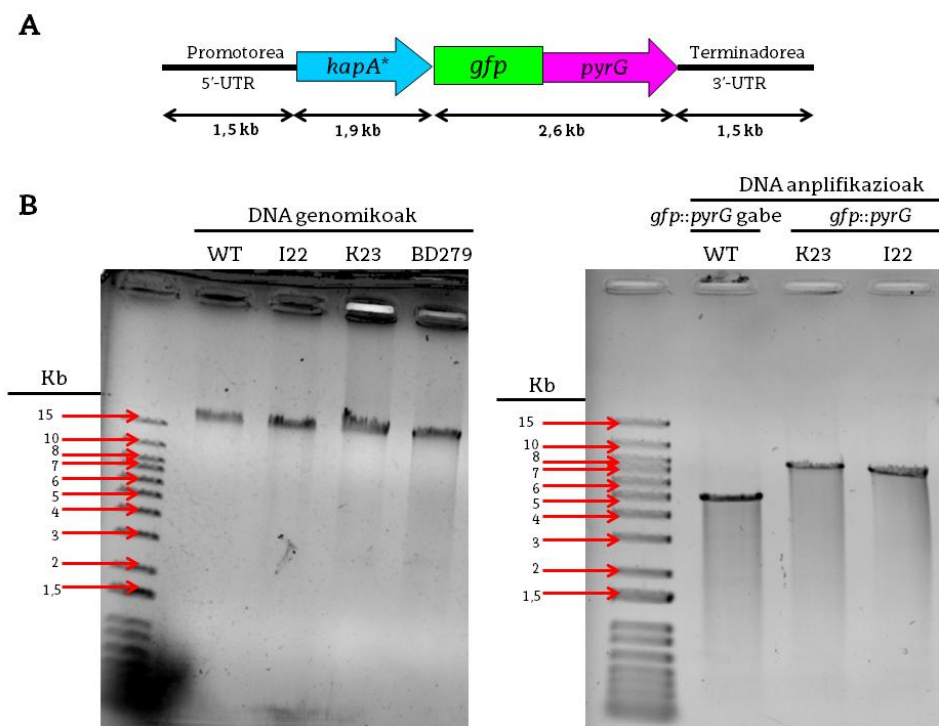
E1. Irudia: Aztertutako anduien ezaugarritze fenotipikoa. Adierazitako lau anduien (WT, I22, K23 eta BD279) fenotipoak 5,5 cm-ko diametroa duten Petri plakatan, MMA-n (A panela), NaH_2PO_4 (0.5M) duen MMA-n (B panela) edo sakarosa (1M) duen MMA-n (C panela), 72 orduz eta 30 °C (goiko lerroa panel bakoitzean) edo 37 °C-tan (beheko lerroak) hazi eta gero. Hiru kasuetan, eskuinaldeko grafikoek kolonien batez besteko diametroa adierazten dute andui bakoitzarentzat, desbideratze estandarrekin batera (bi neurketa andui bakoitzarentzat).

Medio minimoan eta 37 °C-tan, I22 eta K23 andui mutanteak akonidialak direla ziurtatu da, temperatura horretan KapA-ren funtzionaltasuna galdu egiten delako ziurrenik (ikus 1A irudia). Aldiz, andui

horiek 30 °C-tan andui basatiaren fenotipo bera edo oso antzekoa dute. Ikusten den bezala, tenperaturak hazkuntzarengan eragin nabaria du, kolonien erradioak handiagoak direlarik 37 °C-tan, I22 mutantean ezik. Honek, mutante honetan azaltzen diren KapA-ren mutazioek hazkuntzarengan ere eragin nabaria dutela iradokitzen dute. Azkenik, BD279 anduiari dagokionez, hau aztertutako bi tenperaturatan andui basatia baino gutxiago hazten da erradialki. Honek, KapA-ren forma basatiaren etiketatzeak ere (GFP-rekin kasu honetan) hazkuntzarengan eragina duela iradokitzen du. NaH₂PO₄ (0.5M) duen MMA medioan (ikus 1B irudia) alelo mutanteen termosentikortasuna galdu egiten da, eta bai I22 bai K23 mutanteek fenotipo konidiantea erakusten dute, erradialki andui basatia baino gutxiago hazten diren arren (% 25 inguru gutxiago bi kasuetan). Pareko emaitzak lortu dira sakaroadun (1M) MMA medioan (ikus 1C irudia). Honetan ere andui basatia baino gutxiago hazi dira I22 eta K23 mutanteak (% 10 inguru gutxiago bi kasuetan) dira I22 eta K23 mutanteak. Emaitzek, orokorrean, I22 eta K23 mutanteen fenotipo termosentikorra, estres egoera jakinetan, leheneratu eta inhibititu daitekeela erakusten dute.

4.2. Mutanteen sekuentziak eta analisi bioinformatikoa

Sekuentziak prozesuari esker, mutanteen *kapA* genean aurkitzen diren mutazioen identifikazioa egin da, gerora mutazio hauek KapA proteinaren egituran izan dezaketen eraginaren aurreikuspena egiteko asmoz (ikus aurrerago). Nolanahi ere, sekuentziak hauek bideratzeko, lehenik, DNA genomikoaren erauzketa eta hainbat PCR bidezko amplifikazio burutu dira. Prozesu hauen egokitasuna baieztatzeko (bai DNA-ren integritatea bai tamaina ere) agarosa elektroforesi bidezko egiaztapenak egin dira, beharrezko prozedura jarraitu ondoren (ikus 3.3.2 sekzioa; ikus ere E2 irudia).



E2. Irudia: Etidio bromurotan tindatutako agarosa gelak GrAL honetan zehar erabilitako DNA laginen integritatea eta tamaina egiaztatzeko. **A)** DNA genomikoaren erauzketa ondoren amplifikatu beharreko konstrukzioa (aldaera basatian *gfp::pyrG* etiketa gabe) eta fragmentuen tamaina (kb). **B)** *ChemiDoc™ MP system* makina bidez lortutako agarosa gel argazkiak. **Ezkerreko irudia;** abiapuntuko anduien DNA genomikoaren erauzketen egiaztapena. Ezkerretik eskuinera: PM markatzailea (ikus banden tamaina), erreferentziatzko andui basatia (WT), I22 ($KapA^{I22}::GFP$), K23 ($KapA^{K23}::GFP$) eta BD279. *A. nidulans*-en DNA genomikoaren laginak 15 kb ingurutik gorako banda bakar bezala ikusten dira agarosa elektroforesian. **Eskuineko irudia;** Sekuentziatu beharreko PCR amplifikazio produktuen (Imp5 eta Imp4 oligonukleotidoak erabili dira, hau da, promotorearen hasieratik terminadorearen amaierara hibridatu da; ikus 3.3.4 sekzioa) egiaztapena. Ezkerretik eskuinera: PM markatzailea, 5'-UTR- $KapA^{WT}$ -3'-UTR (~ 5 kb), 5'-UTR- $KapA^{K23}::GFP::pyrG$ -3'-UTR (~ 7,5 kb) eta 5'-UTR- $KapA^{I22}::GFP::pyrG$ -3'-UTR (~ 7,5 kb).

Irudian ikus daitekeen bezala, DNA genomikoak zuzen erauzi dira eta PCR erreakzioetarako kantitate, purutasun eta integritate egokia dute, bilatutako fragmentu eta fusioak amplifikatu egin baitaitezke, E2B panelean,

eskuineko irudiak erakusten duen bezala. Bi mutante aldaeren (I22 eta K23) *kapA* geneak etiketa du (*gfp::pyrG*) eta aldaera basatiak ez, horregatik azken honek tamaina txikiagoa du (2,6 kb txikiagoa zehazki).

4.2.1. Nukleotido eta aminoazido mutazioen identifikazioa

Behin egiaztapen hauek egin eta laginak euren osotasunean erauzi/anplifikatu direla, mutanteen *kapA* genearen Sanger sekuentziazioa burutu da mutante bakoitzak dituen mutazioak identifikatzeko (ikus 3.4 sekzioa). Horretarako, E2B paneleko eskuineko irudiko PCR produktuak erabili dira. PCR produktu bakoitzaren bina lagin hartu dira eta lagin bakoitza Imp9 edo Imp2 oligonukleotidoak (*kapA*-ren hasiera edo bukaerarekin hibridatzen direnak; ikus M1 irudia) erabiliz sekuentziatu dira. *kapA* gene mutanteen nukleotido sekuentziak gene basatiaren sekuentziarekin alderatu eta aurkitu diren mutazioak identifikatu eta markatu dira.

```

1  ATGGCCGAACGCTATATCCAGAGCATCGCCGCAACCAATACAGGCTCGAAACCAAGTTTCGGCCTGATGAACTCCGCGCTCGTGTAGGAGCAGCAAG 100
101 TCGAAATTCGAAAGCAGAAGAGAGAGAAAACCTGGCCAAGCGACGTGGTATCCAGACTCGGGATGGCGGAATTGGTGTAGGAGGTGGCATGGCTGCCGC 200
201 CGAGAGTGACGACGAGGCGAGCGCTATTGAAAGTGAGGTATGATGATCTACTTATACTCTTATGTCGCTCTATTTTATGCTGGTGTACCGTGGCCAT 300
301 AAACCTCATGTGCTTCTCCTTTGTCCTTTGAGGCAGATGCTCACCGCCCTAACATGGTCTTATCATCGCGGGGAATATATGGCCGGCGTTCTAGTTTT 400
401 TGGCGCTGGTTCATTGACACCATGTCCGAAAAGCGAAATGTGCTAATATGGCCCTCCTTAGCTCAATGTCGAGTTACCAGAGATGGTCAAGGGTGTTC 500
501 TCCGACCAAATCGAAGCTCAAATCCAAGCGACAACCAAGTTCAGAAAGCTCCTCCAAAGAACGTAACCCGCCATCGTGGCGCTTATCGAGACTGGT 600
601 TGGTTCCCGTTTGTGGAATACCTCCGATCCCTCACACTTTAGTCCAATTTGAGGCTGCTTGGGCCTTACCAACATCGCATCTGGATCTGCGCAACA 700
701 GACTCAGTGGTTATTGAGGCTGGCGCGTGCCAATTTTCGTCGAGCTATTGAGCAGCCAGAACCTGATGTGCGCGAACAAGCCGTTTGGCCCTCGGA 800
801 AACATTGCTGGTATAGCCCTCAATGCCGCGACTTCGTTCTTAACGCCGGGCTCTGCGCCCTCTCTTGACTCTGATTAATGATGGTCGCAAGATTAGCA 900
901 TGCTGCGCAACGCTACTTGGACACTGAGCAACTTCTGCCGTGGCAAGACTCCTCAGCCTGATTGGAACAGGTATGTTACTTCCGGATCAGCACGTAAC 1000
1001 CTACGGCCCTTACTAACATTCCGCCAGATTGCTCCCGCCCTCCTGTTCTTCCCAAGCTCATTACATGCTTGATGACGAGGTCTCATTTGATCATGCT 1100
1101 GGGCIATCTCGTACCTTTCCGATGGTCCCAATGAGAAGATCCAAGCCGTCATCGAAGCCGGCATTCCCGTGCCTTGTAGAGCTCTTGTGACGCGCTC 1200
1201 CACCTCTGTTCCAGACCCCGCCCTTCGTTCCGTGGCAACATCGTCACTGGTGTATGATGTTCCAGACACAGGTTATCATCAATGGCGTGGCTCTTCTGCT 1300
1301 CTTCTCTCCCTCTTAGTCAACAAAAGATGGTATCAGGAAAAGACTTGTGGACCATTTCCAAACATCACTGCCGTAACCTCCAGTCCAGATCAATCTG 1400
1401 TTATCGATGCTGGTATCATCCCCCGCTTGTGCATCTCCTTGCCAACGGTGACTTCAAGACTCGCAAGGAAGCTTGTGGGCTATTTCGAATGCCACATC 1500
1501 CGGTGGTCTGCAAGCCGACAGATCCGCTACCTTGTACTCAAGGGTGCATCAAGCCTCTCAAGTACCTCCTAGCCTCCTAGCGCTGATCAACAAGATCATC 1600
1601 CAAGTTGCTCTCGATGGCCTTGAGAACATTCTCAAGTTGGTGGAGATGGACAAGGAGGCTGGACAGGGTGACGCTCACGTGAACCGCTATGCCTTGTTA 1700
1701 TTGAAGAGGGTGGTGGTATGGAGAAGATCCACGACTGCCAGAACAATGCCAACGAAGAGATCTACATGAAGGCATACAATATCATCGAGAAGTACTTCTC 1800
1801 AGATGAAGACGAGGCGCGGGTGACATTGATGAACCTGCTCCTCAACAAACACAGACTGGATTTACTTTGGGCGCCACTCAACAACAGCCTGGTGGGTT 1900
1901 TCTTCGGCGGTGCCAATGGCGCGATTCCATGGATATGTAA 1942

```

E3. Irudia: *kapA* genearen nukleotido sekuentzia. Kolore horiz introiak markatu dira. Era berean, kolore urdinez I22 alelo mutantean aurkitutako nukleotido mutatuak identifikatu dira (T622A; G1012A; G1094A; G1287T; T1565A) eta kolore berdez, ustez, K23 aleloan aurkitutako nukleotido mutatuak (A580T; T602G; T611G).

Ikusienez, I22 alelo mutantearen *kapA* genean bost nukleotido mutatu aurkitu dira. Horietatik lau exonikoak dira eta eragina izan dezakete KapA-ren funtzioan. Bosgarrena, ordea, intronikoa da, eta introiei dagokien sekuentziak transkripzioan ezabatu egiten dira (ez dute aminoazidorik kodetzen). Horregatik, azterketa bioinformatikotik baztertu egin da mutazio introniko hau. K23 aleloan, bestetik, 3 mutazio exoniko aurkitu dira, sekuentziazioekin alelo horren sekuentzia guztia aztertu ezin izan den arren (% 90 inguru).

Sekuentzia genomiko mutante hauetatik abiatuta, sortuko den proteinaren sekuentzia zein izango den aurreikusi daiteke, hiru nukleotidok (kodoi izenarekin ezagutzen dena) aminoazido bat kodetzen baitute. Horrela, KapA proteina mutanteen sekuentziak proteina basatiaren sekuentziarekin alderatu eta aurkitu diren mutazioak markatu dira.

```

1 MAERYIPEHRRITQYKARNQFRPEDELRRLRRREEQQVETIRKQKREENLAKRRGIQTRDGGIGVGGMAAAESDDEASAI ESELNVELPEMVKGVFSDQIEAQI 100
101 QATTKFRKLLSKERNPPIRVLETGVVSRFVEYLRS PHTLVQFEAAWALTNIASGSAQQTQVVIEAGAVPIFVELLSSPEPDVREQAVWALGNIAGDSPQ 200
201 CRDFVLNAGALRPLLTLINDGRKISMLRNATWTLNFCRGGKTPQPDWNTIAPALPVLAKLIYMLDDEVLIIDTCWAI SYLSDGPNEKIQAVIEAGIPRRLV 300
301 ELLMHASTSVQTPALRSVGNIVTGDVVQTVIINCVALPALLSLLSSTKDGIRKEACWTI SNITAGNSSQIQSVIDAGIIPPLVHLLANGDFKTRKEACW 400
401 AISNATSGGLQKPDQIRYLVLTQGCIKPLSDLLACPDNKI IQVALDGLLENILKVGEMDKAEGQGDHAVNRYALFIEEAGGMEKIHDCCQNNANEET YMKAYN 500
501 IIEKYFSDDEEAAGDIDELAPQQTQTGFTLGATQQQPGGFSFGGANGGDSMDM 553

```

E4. Irudia: KapA proteinaren aminoazido sekuentzia. Kolore urdinez I22 alelo mutantean egongo lirakeen mutazioak (F133Y; A272T; G336V; C429S) eta kolore berdez K23 alelokoa (E119V).

Oraingoa, I22 alelo mutantearen lau mutazio horiek, beste hainbeste aminoazidoren aldaketak eragiten dituzte (E3 irudian deskribatutako I22-ren mutazio exonikoek parte hartzen duten kodoiek E4 irudiko I22-ren aminoazidoak kodetu dituzte, hurrenez hurren). K23 aleloan, berriz, mutazio bakarra kontsideratu da, nahiz eta DNA sekuentzian 3 mutazio aurkitu diren. Kasu honetan, nukleotido mutatua basatiarekiko berdina izan ez arren, aminoazido berdina kodetzen dute (kodoi sinonimoa), hau da, DNA sekuentziako 602 posizioko mutazioak kodoi desberdina osatzen du; GTT (basatia) eta GTG (mutatua), baina aminoazido bera kodetu; balina (V). Berdina gertatzen da 611 posizioko mutazioarekin, beraz, aminoazido desberdina (basatian eta mutantean) kodetzen duen mutazioaren kodoia 580. posiziokoa da.

4.2.2. KapA proteinaren egitura hirudimentsionalaren eta identifikatutako mutazioen eraginaren aurreikuspen bioinformatikoa

Azkenik, aminoazido sekuentzian identifikatutako mutazio hauek KapA proteinaren egituran eta konformazioan zer nolako eragina izan lezaketen aurreikusi da. Horretarako, *Dynamut* programa erabili da (ikus 3.4 sekzioa), honek proteina basatiaren egitura hirudimentsionala eraiki, mutazioen kokapena auresan eta mutazioek egitura nola ezegonkortzen edo egonkortzen duten iragarri egiten du. E1 taulak I22 eta K23 mutazioen informazioa biltzen du, baita *Dynamut* programak ematen dituen parametroen balioak ere.

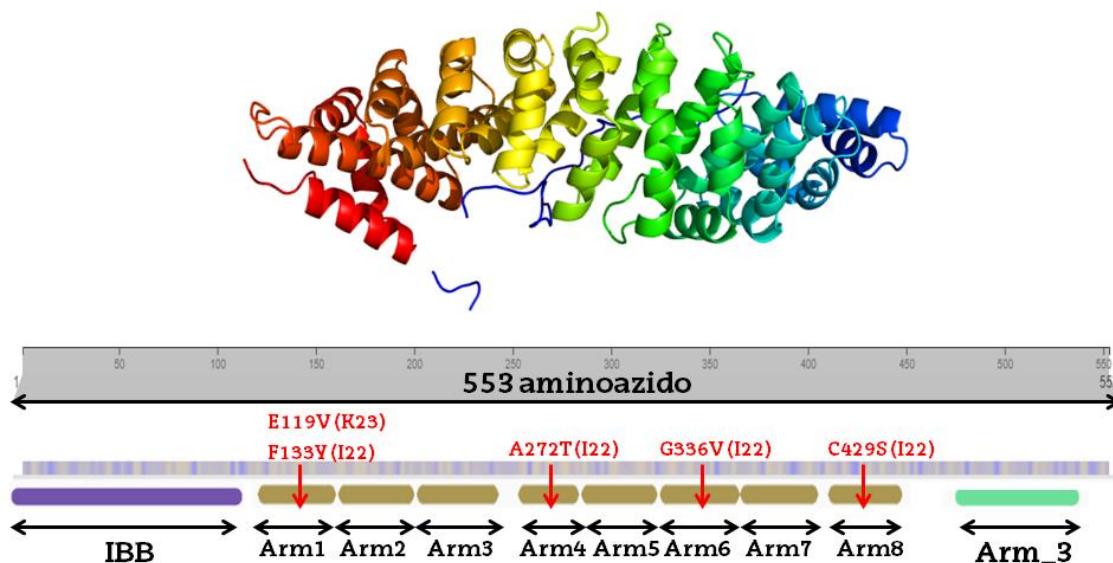
E1. Taula: KapA proteinaren bi aldaera (I22 eta K23) mutanteetan aurkitutako mutazioen laburpena. Informazio hau (Laburpena zutabea) *Dynamut* programan gehitu da, eta besteren artean (ikus aurrerago) mutazio bakoitzak proteinaren energia askean duen eragina kuantifikatu egiten du (azken zutabea, ΔEBE). Balio horren zeinuaren arabera, programak mutazioak eragin egonkortzailea edo desegonkortzailea duen proposatzen du. Lehenek, beste proteinekiko interakzioa inhibitzen, baina egitura hirudimentsionala egonkortzera joko lukete, bigarrenek kontrako eragina izango luketen bitartean.

Anduia	Aminoazido basatia	Posizioa (aa)	Aminoazido mutatua	Laburpena	ΔEBE (kcal/mol·K)
I22	Fenilalanina (F)	133	Tirosina (Y)	F133Y	0,080
I22	Alanina (A)	272	Treonina (T)	A272T	-0,401
I22	Glizina (G)	336	Balina (V)	G336V	-0,012
I22	Zisteina (C)	429	Serina (S)	C429S	0,227
K23	Az. glutamiko (E)	119	Balina (V)	E119V	0,06

Aipatu bezala, *Dynamut* programak egitura nola ezegonkortsu edo egonkortzen den aurreikusten du. Hau ΔEBE (energia bibrazional entropikoaren aldaketa) parametroari esker kalkulatu da. Beste modu batean azalduta, egituraren entropiak (maila molekularreko desordena)

eragiten duen energia bibrazionalaren aldaketa neurtzen da. $\Delta EBE = 0$ denean egitura egonkorra delarik, $\Delta EBE < 0$ bada egitura zurrunagoa da eta $\Delta EBE > 0$ bada egitura malguagoa da. Horrela, egituraren egonkortasuna aldatzeaz gain beste proteinekin interakzionatzeko joera aldatuko litzateke ere, egitura ezegonkortzean alboko proteinekin interakzioa handituz, adibidez, egonkortasunaren bila. Eragin hauek egitura hirudimentsionalean kolore bidez azaltzen dira, kolore gorriak malgutasuna eta urdinak zurruntasuna adierazten dutelarik (ikus E6 irudia).

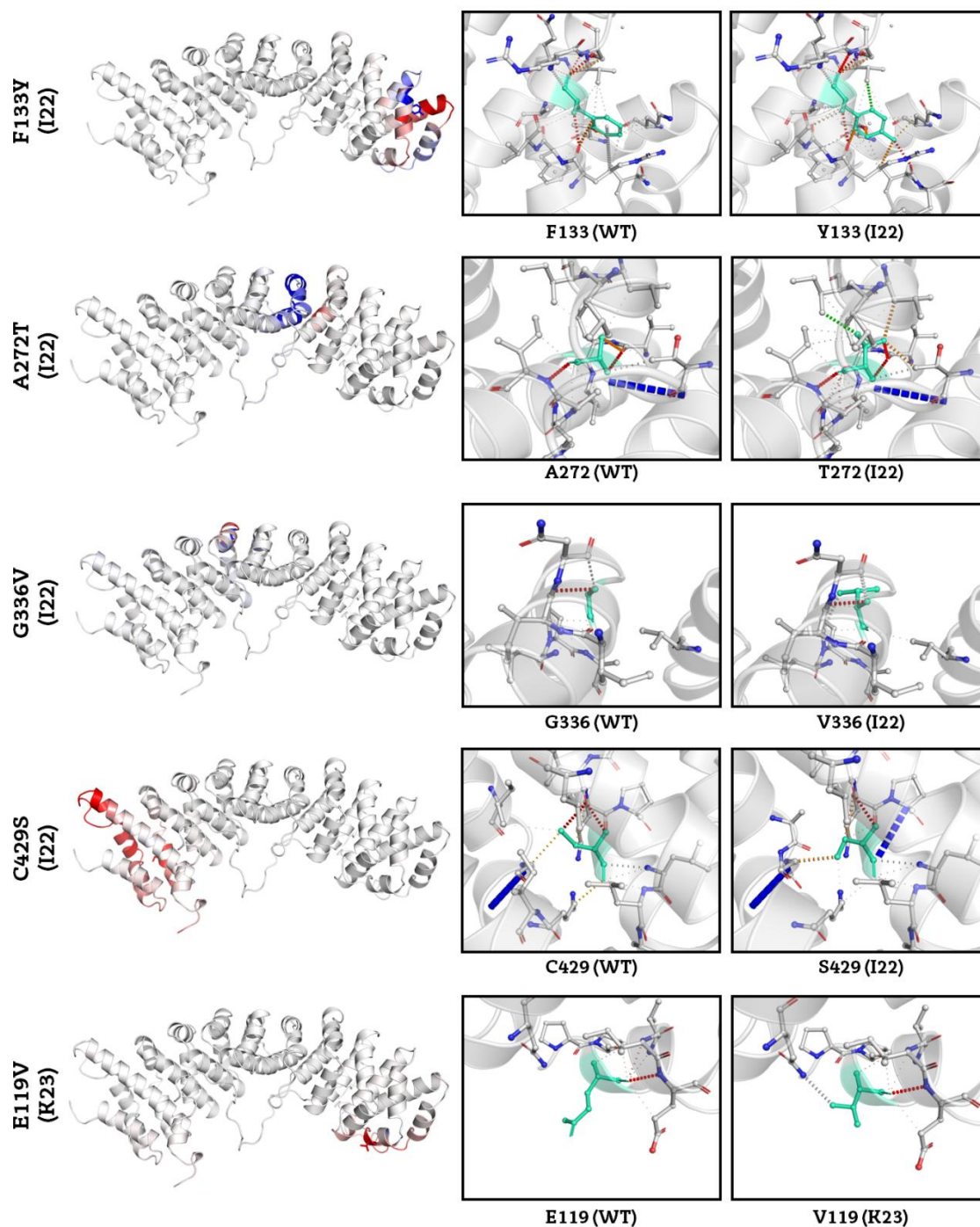
Kalkulu hauek egiteko, 553 aminoazidoz osatua dagoen KapA proteinaren egitura basatia erabili da erreferentzia bezala (ikus E5 irudia). Proteina hau bi eremu nagusitan banatzen da. Lehenengoa, IBB eremuari dagokio (*importin- β binding domain*, β -inportinarekin lotu eta heterodimeroa osatzeko eremua; ikus Sarrera) eta 1-104 aminoazidoen artean luzatzen da. Bigarren eremua gainontzeko sekuentziari dagokio (115-450 aminoazidoen artean luzatuz). Honetan, armadillo izeneko (Arm) egitura karakteristikoa (NLS sekuentziekin interakzioa egiten duen eremua da; [17]) 8 aldiz errepikatzen da. Azkenik, Arm_3 eremua, bestelako proteinekin interakzionatzeko funtzioa duena, 468-522 aminoazidoen artean luzatzen da. Gogoratu behar da, lan honetan aztertu diren KapA-ren forma mutanteek GFP etiketa dutela C-terminalean, bukaeran alegia.



E5. Irudia: *Phyre2* programak egindako KapA proteina basatiaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena. Kolore urdinak proteinaren N-terminal

ertza (hasiera) adierazten du, gorriak C-terminala (bukaera) adierazten duen bitartean. Behealdean, berriz, *InterPro* base datuaren arabera KapA proteinaren aminoazido sekuentzia eta hau osatzen duten eremu funtzionalak adierazten dira, baita identifikatutako mutazioen kokapena ere.

Aztertutako mutazio bakoitzarentzat energia bibrazional entropikoaren aldaketaren balioa emateaz gain, *Dynamut*-ek proteina baten forma mutanteen egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena egin dezake (ikus E6 irudia). Erabiltzaileak zehazten dio algoritmoari zein aminoazido ordezkatzeko den eta mutazioaren posizioa. Honek, aminoazido aldaketa horren eraginez, eremuan ematen diren aminoazidoen arteko lotura intermolekularren aldaketak aurreikusi eta hauek egiturari nola eragiten dioten aurreikusten du. GrAL honetan analisi bioinformatiko hau I22-ren mutazioak banaka aztertuz burutu da, *Dynamut*-ek hala eskatzen baitu eta, bestetik, ez dakigulako mutazio bakarra edo bat baino gehiago diren fenotipo termosentikorraren eragileak.



E6. Irudia: KapA proteina basatiaren egituran mutazio desberdinen posizioen aurreikuspena eta eragina (proteinen malgutasuna kolore gorria eta zurruntasuna urdina) irudikatu dira, eskuinaldean mutazio hauetako bakoitzak proteinen aminoazidoen arteko interakzio molekularretan izango luketen eragina aurreikusten delarik (ezkerrekoa aminoazido basatia, eskuinekoa mutatu).

Ikus daitekeenez, eta E1 taulan aipatu den moduan, mutazio guztiek era batean edo bestean eraldatzen dute egitura. F133Y (Arm1) mutazioan, lehenik kontutan hartu behar da bai fenilalanina (F) bai tirocina (Y) aminoazido aromatikoak direla. Alegia, bakoitzak R taldean feniloa dute. Tirocinak, aldiz, fenilo horren para posizioan hidroxilo taldea du, azken honek hidrogeno-lotura berriak eragingo lituzkeelarik. Gainera, mutazio honek ere interakzio hidrofobiko izeneko efektua eragingo lukeela aurreikusten da, modu honetan erradikal hidrofoboan hurbilketa emango litzateke, entropia gutxi handituz (egiturak malgutasuna irabazi).

A272T mutazioaren kasuan, Arm4 eremuan kokatuko litzatekeena, treonina (T) batek ordezkaten du posizio horretako alanina (A) aminoazidoa. Azken hau aminoazido hidrofobikoa da, treonina aminoazido polarren artean sartzen den bitartean, alkohol talde bat duelako bere R taldean. Honek, aurreko kasuan ikusi bezala, hidrogeno-lotura berriak eragingo lituzke, eta bestalde, interakzio hidrofobiko efektua emango litzateke, oraingoan, entropia nabari txikituz (zurruntasuna irabazi).

I22 aldaera mutantearen hirugarren mutazioan, G336V (Arm6 eremuan), balina (V) aminoazidoak glizina (G) ordezkaten du. Glizina aminoazido guztien artean txikiena eta akirala den bakarra izan arren, mutazioak egitura sekundarioan duen muturreko kokapena dela eta, izandako eragina ia arbuigarria da (zurruntasuna oso gutxi irabazi), eragin hau balina molekularren tamaina pixka bat handiagoa delako ematen delarik (lotura molekular berririk ez).

I22-ren azken mutazioa C429S da, Arm8 eremuan kokatzen dena. Serinak (S) zisteina (S) aminoazidoa ordezkatu egiten du, biak polarrak eta hidrofiloak direlarik. Zisteina aminoazidoak duen tiol taldeari esker proteinaren egitura hirudimentsionalean garrantzitsuak diren disulfuro-zubiak sortzen dira maiz. Aminoazido honek erredox erreakzioetarako ere berebiziko garrantzia izaten du, erraz oxidatu (disulfuro zubia sortuz, adibidez) eta erreduzitzeko gaitasuna baitu (disulfuroa apurtuz, adibidez, eta berriz -SH egiturara itzuliz). Berriz, serinak hidroxilo taldea du, baina honen isomeria optikoa dela eta ez dira lotura berririk eratu, bai ordea interakzio ionikoa (gatz-zubia), erradikal ionikoen hurbilketa eman eta entropia

handituko lukeena (malgutasuna irabazi). Nahiz eta *Dynamut* programak egindako aurreikuspena hau izan, aipatutako zisteina aminoazidoa ordezkatzean proteinaren egitura eta funtzioarengan eraginak nabariagoak izan daitezkeela pentsatu daiteke.

Azkenik, K23 aldaerako mutazio bakarrean, E119V (Arm1), balinak (V) azido glutamiko (E) ordezkatzeko, lehenengoa hidrofobikoa delarik eta bigarrena negatiboki kargatua dagoelarik. *Dynamut* programak aurreikusitakoren arabera, egitura sekundarioan duen muturreko kokapenagatik mutazio honek izan litzakeen eraginak ia arbuiagarriak direla ematen du, entropia oso gutxi handituz (malgutasuna irabazi). Programak egindako aurreikuspenak efektu arinak iradokitzen dituen arren, aminoazidoen izaera kontrajarria da, beraz benetako eragina esperimentalki aztertu beharko litzateke.

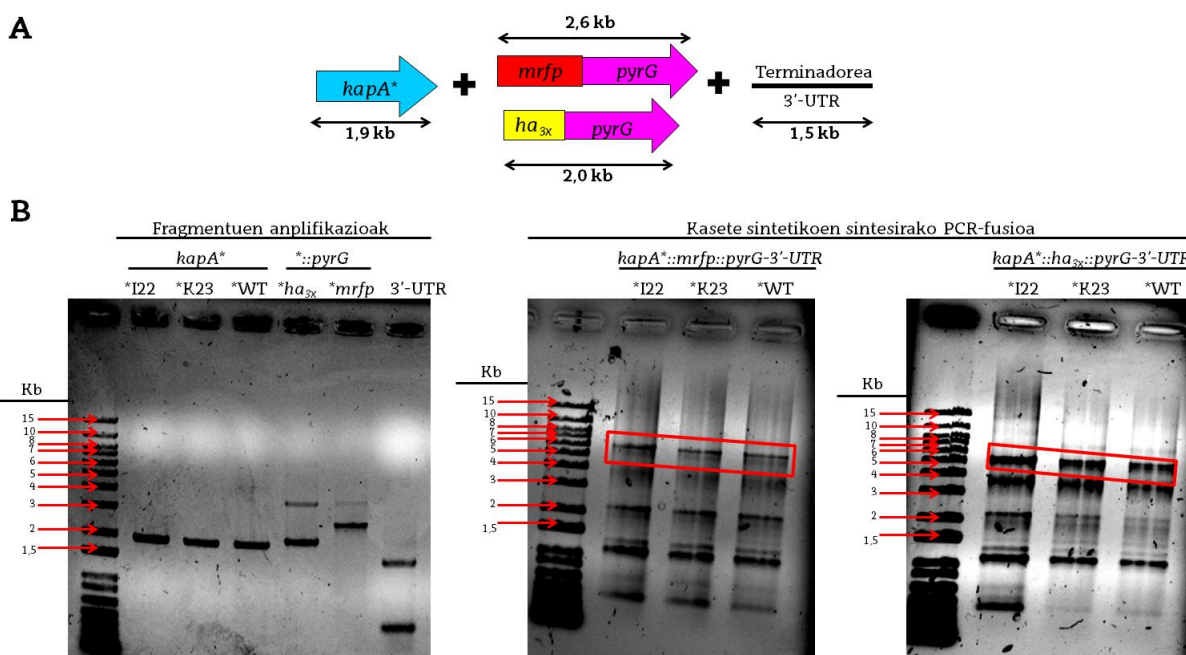
4.3. KapA mutatua eta GFP::FlbB kimerak adierazten dituzten andui errekonbinanteen sorrera eta ezaugarritze fenotipikoa

Behin I22 eta K23 aleloen mutazioak identifikatuta eta hauek proteinaren egituran izan lezaketen eragina aurreikusita, lanaren hirugarren helburuari heldu zaio. Honekin, ikertu nahi da KapA-ren I22 edo K23 bertsio mutanteek GFP::FlbB kimera adierazten duen anduiaren (BD185) FlbB-ren lokalizazioarengan izan lezaketen eragina. Horretarako, BD185 anduiaren protoplastoak lortu (ikus 3.3.5 sekzioa) eta fusio-PCR erreakzio bidez lortutako produktu egokiek transformatu dira, kasete sintetiko hauek BD185 anduiaren genomari integratu ahal izateko.

BD185 anduiak, esan bezala, *flbB* genearen hasieran (5' ertzan) GFP etiketa kodetzen duen sekuentzia du. Era berean, bi aldaera mutanteek *kapA* genea GFP etiketa kodetzen duen sekuentziarekin fusionatuta dute ere. Beraz, kasete sintetiko berriak diseinatu eta sortu behar izan dira, sortutako andui errekonbinanteetan KapA-k FlbB-rekiko etiketa desberdina izan dezan. Hain zuzen, mRFP eta HA_{3x} etiketak erabili dira (ikus M1 irudia). Bai GFP baita mRFP ere etiketa fluoreszenteak dira (*green/monomeric red fluorescent protein* ingelesez); beraz fluoreszentsia mikroskopioa erabiltzeko unean kolore

desberdinen erabilera garrantzitsua izango da bakoitzaren identifikaziorako. Bestetik, mRFP edo HA_{3x} erabiltzeak bestelako abantailak eskaintzen ditu. mRFP etiketa GFP-ren tamaina berekoa da; horrela, GFP-rekin etiketatutako KapA-ren forma mutanteen portaera bera izan beharko lukete mRFP-rekin etiketatutakoek, bai 30 bai 37 °C-tan. HA_{3x} etiketa, aldiz, GFP edo mRFP etiketak baino askoz ere txikiagoa da (~10 aldiz). Horrela, etiketaren tamainak KapA-ren aktibitatearengan eta anduien fenotipoan duen eragina aztertzeke aukera izan da. Alegia, ea KapA-ren etiketaren tamainak fenotipo termosentikorrean eraginik duen ala ez aztertu nahi izan da. Etiketa guztiek momenturen batean antigorputz bidezko immunodetekzio probak egitea ahalbidetzen dute ere, beharrik izanez gero.

Fusio-PCR bidez sortutako kasete sintetikoaren tamaina baieztatzeko, eta gutxi gora beherako kontzentrazioa ezagutzeko, produktuen laginak hartu eta agarosa elektroforesi bidez aztertu dira (ikus E7 irudia).



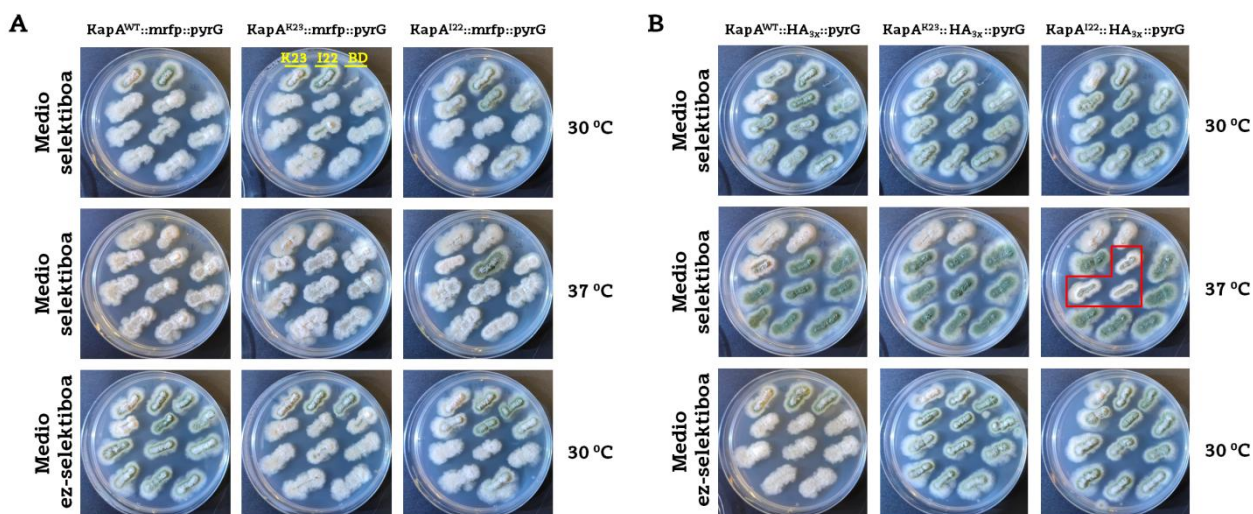
E7. Irudia: Etidio bromurotan tindatutako agarosa gelak GrAL honetan zehar erabilitako DNA laginen integritatea eta tamaina egiaztatzeke. **A)** Fusio-PCRan lotzeko independienteki amplifikatutako fragmentoak eta euren tamainak (kb). *kapA* genearen aldaera desberdinak (WT, K23 eta I22) amplifikatu dira, batetik, *mrfp::pyrG* edo *ha_{3x}::pyrG*, bestetik, eta terminadorea, azkenik. **B)** *ChemiDocTM MP system* makina bidez lortutako agarosa gelen

argazkiak. **Ezkerreko irudia;** A panelean ikusten diren fragmentu bakoitzaren amplifikazioen egiaztapena. Ezkerretik eskuinera: PM markatzailea, KapA^{I22} (~ 1,9 kb), KapA^{K23} (~ 1,9 kb), KapA^{WT} (~ 1,9 kb), HA_{3x}::pyrG (~ 2,0 kb), mRFP::pyrG (~ 2,6 kb) eta *kapA* terminadorea (~ 1,5 kb). **Erdiko irudia;** fusio-PCR erreakzioetan lortutako mRFP etiketa kodetzen duen sekuentzia duten kaseteen egiaztapena (karratu gorrian). Ezkerretik eskuinera: PM markatzailea, KapA^{I22}::mrfp::pyrG-3'-UTR (~ 6 kb), KapA^{K23}::mrfp::pyrG-3'-UTR (~ 6 kb) eta KapA^{WT}::mrfp::pyrG-3'-UTR (~ 6 kb). **Eskuineko irudia;** fusio-PCR erreakzioan lortutako HA_{3x} etiketa kodetzen duen sekuentzia duten kaseteen egiaztapena (karratu gorrian). Ezkerretik eskuinera: PM markatzailea, KapA^{I22}::HA_{3x}::pyrG-3'-UTR (~ 5,4 kb), KapA^{K23}::HA_{3x}::pyrG-3'-UTR (~ 5,4 kb) eta KapA^{WT}::HA_{3x}::pyrG-3'-UTR (~ 5,4 kb).

Irudian ikus daitekeen bezala, fragmentuen PCR bidezko amplifikazio erreakzioak (E7B paneleko ezkerreko irudia) zuzen egin dira, lortutako laginen integritatea eta tamaina egokia baita. Fragmentu egokiak edukita, kasete sintetikoaren (fusio-PCR-ak) konstrukzioa egin eta lortutako emaitzak E7B paneleko erdiko eta eskuineko irudietan ikus daitezke. Fusio hauei dagokien banda karratu gorrien bidez adierazten (6 kb eta 5,4 kb-tako tamainak, hurrenez hurren, *mrfp* edo *ha_{3x}* duten fusioentzat) dira, gainontzeko bandak amplifikazio inespezifikoak direlarik.

Behin fusio-PCR produktuetan esperotako kaseteak (DNA inespezifikoak ere eduki arren) badaudela baieztatuta, sekzio honen arestian aipatu bezala, BD185 anduiaren protoplastoak transformatu eta transformanteak isolatu dira (E8 irudia). Isolatzen prozesuan kontrol plaka desberdinak erabili dira. Batetik, medio selektiboari (urazilo eta uridina elikagaiak ez dituen, hau da, transformanteak bakarrik haztea ahalbidetuko duen kultura medioa) beste elikagai bat kenduta, transformante guztiak hil egiten zirela baieztatu da (ez erakutsia). Bestetik, andui parentalaren (transformatua izan den anduia; BD185) fenotipoarekin konparaketak egiteko, medio ez-selektibodun (uridina eta uraziloduna, aurreko kasuarekiko kontrakoa, bai transformanteak bai transformatu gabeko koloniak haztea ahalbidetuko duena) Petri plakak ere presatu eta behatu dira. Medio selektiboko plakak bikoiztu egin dira, fenotipoak bai 30 °C-tan eta 37 °C-tan

konparatu ahal izateko. Berezko I22 eta K23 mutanteak ere Petri plaka guztietan inokulatu dira, fenotipoak konparatu ahal izateko.



E8. Irudia: Egindako transformazio desberdinetan lortutako transformanteen kolonien fenotipoak, BD185 andui parentala eta I22 eta K23 mutanteekin batera (ikus A panela, erdiko zutabea goiko lerroa), 9 cm-ko diametroa duten Petri plakatan, medio selektiboan (lehenengo eta bigarren lerroak) eta ez-selektiboan (hirugarren lerroa), 72 orduz eta 30 °C edo 37 °C-tan (soilik medio selektiboan) hazi eta gero. **A)** mRFP::pyrG etiketa adieraziko luketen transformanteak eta **B)** HA_{3x}::pyrG etiketa adieraziko luketen transformanteak.

mRFP eta HA_{3x} etiketadun kasetekin sortutako transformanteen fenotipoak aztertuz (E8 irudia, A eta B panelak, hurrenez hurren), ikus daiteke medio ez-selektiboan (hirugarren lerroa) aipatutako BD185 andui parentala hazi dela, medio selektiboan (lehenengo eta bigarren lerroak) ez bezala. Era berean, K23 eta I22 andui parentalak ikusirik, soilik 30 °C-tan konidiatu dute, eta ez 37 °C-tan, 4.1 sekzioan ikusi den bezala, fenotipo termosentikorraren adierazle.

Bestalde, mRFP etiketarekin eta medio selektiboan egindako inokulazioetan, transformazioak modu egokian egin direla ziurtatu da (koloniak hazi dira urazilo/uridina gabe, BD185 anduiak kasetek genoman integratu ditu beraz) eta bai KapA basatia baita K23-ren KapA bertsioa jaso duten transformanteen fenotipoak aztertuz ikusten da 30 °C zein 37 °C-tan ez

dutela konidiatu. I22 alelo mutantearen *KapA* jaso dutenen kasuan, berriz, bi fenotipo desberdin ikusten dira.

HA_{3x} etiketarekin eta medio selektiboan egindako inokulazioetan transformazioak zuzen eman direla ziurtatu da ere, eta WT/K23 anduiekin transformatutako fenotipoak aztertuz, patroi desberdina ikusi da. Hau da, etiketa txikiagoarekin (HA_{3x} etiketak 0,1 kb ditu eta mRFP etiketak 0,7 kb) 30 °C zein 37 °C-tan transformante koloniak konidiatzeko gai izan dira, espora asexualen kantitate nabaria sintetizatuz (fenotipo basatia), eta berriz ere I22 kasuan bi fenotipo desberdin ikusi dira, bi fenotipo horietatik bat termosentikorra dela dirudi (ikus E8 irudian koadro gorria).

Pentsa daiteke, $KapA^{I22}::HA_{3x}::pyrG$ konstrukzioa jaso eta 37 °C-tan egindako inokulazioan ikusten diren bi fenotipoen artean, fenotipo zuzena akonidiala eta gutxien hazi dena izan daitekeela, termosentikorra izanda, I22 alelo mutantearen fenotipoarekin antzekotasun handiena duelako eta etiketaren tamainarekiko independentea delako. Hala ere, bai A paneleko irudietan baita B panelekoetan ere, I22-rekin transformatutako hainbat koloniak fenotipo desberdina erakusten du, fusio-PCR-tan izandako amplifikazio inespezifikoen presentziaren (ikus E7 irudia) eragina izan daitekeelarik. Arazoa da fenotipo zuzena zein den ezin dela jakin. Horretarako, transformanteetatik DNA genomikoa erauzi eta hauek *Southern-Blot* teknika bidez azertu beharko lirateke, DNA kasete sintetikoen integrazio egokia zeintzuk izan duten aztertzeko (ikus Eztabaida). Bestetik, aurretik deskribatutako mutazioen presentzia baieztatzeko ere, transformante hauen *kapA* aleloa sekuentziatu beharko litzateke guztietan.

5. Eztabaida

Aurretik aipatu bezala, harrera laborategian urteak daramatzate haien ikerketa FlbB transkripzio-faktorean, eta beraz, hau kodetzen duen *flbB* genean zentratuz. Horrela, hainbat kasutan *flbB* genearen mutazio desberdinak eragin dituzte eta hauek FlbB beraren edo FlbE-ren lokalizazioarengan duten eragina aztertu dute [11; 12; 16]. Gauza bera *flbE*-ren kasuan, sarreran esan bezala, bi proteinek bata bestearen beharra baitute hifen puntara iristeko. Azterketa horietan, esaterako, FlbB-ren ustezko NLS-aren mutazio espezifikoek FlbB-ren lokalizazio nuklearra kaltetzen zutela ikusi da. FlbB-ren ustezko NLS-aren sekuentziak, aldi berean, FlbB-ren lokalizazio eta aktibitate transkripzionala α -inportinarekin, KapA-rekin, erlazionatzen zuten, karioferina hau baita FlbB-rena bezalako NLS-ak lotzen dituen.

Lan honetan, ordea, *flbB*-ren mutazioetan zentratu ez eta *kapA* genearen mutazio termosentikorrek ikertu dira. Badira ere aurretik KapA-ren mutazio termosentikorrek eragiten eta analizatzen saiatu diren lanak. Horren adibidea da Lidia Araujo-Bazan doktorearen tesian egindako lanaren zati bat, Eduardo A. Espeso ikertzailearen laguntzaz [18]. Ikerketa honetan, aurretik *Saccharomyces cerevisiae* legamian (onddo unizelular mota bat) aurkitutako α -inportinako mutazio termosentikor bat *A. nidulans* onddoan sartzea erabaki zuten, Arm1 eremuko S111F mutazioa zehazki (kapA31 mutante bezala ezagutzen da hau). Mutazio honek NLS::GFP kimeraren lokalizazio subzelularra kaltetzea eragin zuen tenperatura errestriktiboan. Horregatik, egileek mutazio hau termosentikor bezala definitu zuten eta tenperatura errestriktiboan KapA-ren funtzionaltasuna galdu egiten zela proposatu zuten. Harrera laborategian, kapA31 mutazioak FlbB-ren lokalizazioarengan duen eragina zein izan litekeen aztertu nahi izan da aurretik (argitaratu gabea), ondorio argitara orandik iritsi ez den arren (Oier Etxebeste, komunikazio pertsonala).

GrAL honetan, ordea, hurbilketa esperimentalak aldatu eta Eduardo A. Espeso ikertzaileak ausaz isolatutako mutanteak (ikus 4.1 sekzioa) izan dira abiapuntua. Beraz, mutazio zehatz baten bila joan beharrez, fenotipo termosentikor baten bila joan da jakin gabe fenotipo hori zein mutaziok

sortzen duen. Mutazioaren identifikazioa GrAL honetako helburuetako bat izan da.

Jorrotutako bi aldaera mutanteek interpretazio desberdinak iradokitzen dituzte. K23 alelo mutantean, sekuentziazioaren % 90-a lortu da mutazio bakarra aurkituz, berriz, I22 alelo mutantearen % 100-a sekuentziatu da 4 mutazio identifikatuz. Bi mutanteen arteko fenotipoen kaltetzea ikusirik, hazkuntza eta konidiazio aldetik, esan daiteke I22 mutantea izan dela kaltetuena, horrela geroz eta mutazio kopuru gehiago orduan eta fenotipo kaltetuagoa lortzen dela iradokitzen da, logikoa denez. K23 anduiaren mutazio bakarrari buruzko informazioa ez da zabala, *Dynamut* programak egindako aurreikuspen arina dela eta, baina jakin badakigu E119V mutazioa Arm1 eremuan kokatzen dela, aipatutako *kapA31* mutazioa [18] eta I22 mutantearen F133Y bezala. Ondorioz, hiru kasu hauetan errepikatutako emaitzak iradokitzen du Arm1 eremuko mutazioak ez direla hilgarriak eta mutazio termosentikorrek isolatzeko aukera ematen duela. Hala ere, hilgarritasunaren harira, mutazio hauek ez dira letalak, nahiz eta *kapA* genearen delezioa letala den *Aspergillus nidulans* onddoarentzat [19].

I22 alelo mutantean zentratuz, eta mutazioen kokapenari erreparatuz ikusi da identifikatutako 4 mutazioak armadillo errepikapeneko eremuetan aurkitu direla, eta ez IBB edo Arm_3 eremuetan. Aurreko paragrafoaren hariarekin jarraituta, pentsa daiteke IBB eta Arm_3 eremuak KapA-ren funtzionaltasunerako ezinbestekoak direla, bertako mutazioak letalak izan daitezkeelarik. Armadillo errepikapeneko eremuko mutazioek kargo proteinak lotzeko (ikus Sarrera) funtzioan arazoak egon daitezkeenaren hipotesia mantentzen da (NLS sekuentziekin interakzio dela eta). Nahiz eta suposizioa izan, armadillo eremuetako mutazioek tenperatura errestriktiboan fenotipo akonidiala eragiten dutela adierazten du. FlbB-k NLS bipartita sekuentzia du, α -inportina proteinek ezagutzen duten seinaleen oso antzekoa, beraz, pentsa daiteke 37 °C-tan NLS bipartita irakurtzen duen eremuko mutazio termosentikorra espresatu eta KapA proteinak FlbB lotzeko galera ematen dela. Gainera, legamietan deskribatu den bezala [17], NLS sekuentziekin interakzio nagusia duten eremuak Arm2, Arm3 eta Arm4 dira, eta interakzio baxuenekoak Arm7 eta Arm8, agian *A. nidulans*-en antzeko garrantzia dutelarik.

Informazio honekin guztiarekin, I22 aldaeran identifikatutako lau mutazio hauen artean (F133Y, A272T, G336V eta C429S) izan dezaketen eragina ikusirik G336V mutazioak du efektu gutxiena emaitzetan (Arm6 eremua); egituran eta konformazioan eragindako kalteak ia arbuigarriak izango liratekeelarik. Bestalde, F133Y mutazioa, aurretik aipatu bezala, K23 eta *kapA31* [18] kasuetan bezala fenotipoaren eragile termosentiko garrantzitsua bat izan daiteke. Azkenik, C429S mutazioari buruz bestelako analisi batzuk egin beharko lirateke (*Dynamut*-ek ez du efektu handirik aurreikusi, eta ustez efektu nagusiagoak izan ditzake; ikus E6 irudia), eta A272T mutazioa da, seguruenik, eragin nagusia egiten duena. Ikusi bezala, azken mutazio hau Arm4 eremuan kokatzen da (ustez NLS sekuentziekin interakzio nagusieneko eremua) eta egindako lotura molekular berriek egiturak zurruntasuna irabaztea eragin du. Egitura hirudimentsionala zurruntzearen ondorioz, beste proteinek interakzionateko aukerak inhibitzen du proteinak (konpentsatzeko), kargo molekular lotzeko arazoak suertatuko liratekeelarik.

Honetaz gain, *kapA* genea etiketatzeak eragin desberdin bat adierazten du. BD279 anduiak, zeinak *kapA* basatia GFP-rekin etiketatua duen, MAD1425 anduia (*kapA* gene basatia etiketa gabe) baino gutxiago hazi da edozein baldintzatan (ikus 4.1 sekzioa), termosentikortasun adierarik gabe. Bestalde, etiketa desberdinak gehitzeak hazkuntza baldintzak aldatu ditzakeen hipotesia beste saiakera batean konprobatu da. Transformanteen fenotipoan ikusi bezala (ikus 4.3 sekzioa), HA_{3x} etiketa GFP/mrpf etiketa baino txikiagoa da, beraz etiketak izan dezakeen portaera konprobatu ondoren ziurtatu da hazkuntzan eta konidiazioan eragin duela, KapA-ren aktibitatearengan eraginez. Aldaera basatia eta K23 aleloaren *kapA* geneak jaso dituzten transformanteek mrpf etiketarekin akonidial hazi dira 30 °C zein 37 °C-tan, eta konidiatzeko gaitasunarekin, berriz, HA_{3x} etiketarekin (etiketa txikiagoak, beraz, FlbB lokalizazio subzellularrean eraginik ez duela ustez). I22 alelo mutantean, berriz, aipatu bezala fenotipo desberdinak lortu dira, oraindik egokiak zein diren jakin gabe. Horrela, mutante honetan, K23-an ez bezala, efektu desberdinak eragin ditzakeen mutazioen baten presentzia dagoela pentsatu daiteke oraingoz.

Azkenik, nahiz eta GrAL honen prozedura bideratua egon, bizitako COVID-19 birusaren pandemia mundiala dela eta ezin izan da ikusitakoa baino gehiago egin. Beraz, FlbB eta KapA-ren arteko harreman hipotetikoa, honezkero, ezin izan da frogatu. mRFP etiketarekin transformatutako anduiak badu kasete sintetikoa haren genomak integratua, eta ikusi ahal izan denez akonidiala da 30 °C zein 37 °C-tan. Prozesuarekin jarraitzeko aukera balego, jarraituko lukeen pausoa *Southern-Blot* izeneko teknika egitea izango litzateke, transformantearen genomak insertoaren errekonbinazioa leku egokian egin dela ikusteko. Hala eta guztiz ere, GFP eta RFP etiketak eramateak fenotipoan eragin dezakeela ziurtatu denez, bestelako aukerak posibleak dira KapA eta FlbB-ren arteko harremanean lantzeko, hala nola, *kapA* gene basatia duen anduia GFP::FlbB kimeradun anduiarekin transformatzea eta bien arteko harreman hipotetikoan jorratzea.

6. Ondorioak

GrAL honetatik atera diren ondorio nagusiak hurrengoak dira:

1. I22 eta K23 mutanteen fenotipo termosentikorra MMA-n itzularazi egin liteke estres egoera espezifikotan, fosfato ioiek edo sakarosa kontzentrazio handiek eragindako estrespean esaterako. Baldintza hauetan behatutako fenotipo konidiantea 37 °C-tan, *brlA*-ren adierazpena aktibatzeke beste bide genetikoaren presentzia iradokitzen du, hauek ezezagunak diren arren.
2. I22 edo K23 anduian identifikatu diren mutazioek aldaketa puntualak eragin dituzte. Ondorioz, maila molekularrean proteinaren funtzionaltasuna eta egitura hirudimentsionala alda lezakete. Horrela, aminoazido aldaketa bakar batek fenotipikoki aldaketa handia eragin dezake.
3. KapA etiketatzeak, eta etiketa hauen tamainak, eragin zuzena izan du fenotipoan. Hau kontutan hartu beharrekoa da *kapA*-ren edozein mutaziok bere aktibitatean duen eragina aztertu eta ondorioak ateratzeko.
4. K23 aldaerak ematen duen fenotipoa aldaera basatiak ematen duenaren oso antzekoa denez, mutante honetan identifikatutako mutazioak fenotipo termosentikorraren eragilea denaren hipotesia zalantzan jartzen du. I22-ren kasuan, aldiz, badirudi bere fenotipo termosentikorra mutazioek eragindakoa dela, hori baieztatzeke esperimendu gehiago egin beharko litzatekeen arren.
5. Identifikatutako mutazioak armadillo errepikapeneko eremuetan aurkitu dira, KapA-ren funtzionaltasun galera, beraz, kargoen NLS sekuentziak irakurtzeko eta lotzeko momentuan azalduz.

6. Conclusions

Overall, the conclusions drawn in this project are these:

1. The phenotype of thermosensitive mutants I22 and K23 can be reversed in MMA under specific stress conditions, exactly at high concentration of phosphate ions or sucrose. Under these conditions, the observed conidial phenotype at 37 °C suggests the existence of two other genetics pathways to activate *brlA* expression, although these are unknown.
2. The identified mutations in I22 and K23 are point substitutions. Therefore, it can be concluded that the substitution of a single amino acid can cause significant modifications of the structure, function, and phenotype.
3. The size of the tags used has a direct effect on the phenotype. This must be considered in studies that intend to assess the effect of a specific mutation.
4. The phenotype of the K23 mutant is very similar to the wild phenotype, so the hypothesis of identified mutations on K23 allele could be affect as a thermosensitive phenotype is questioned. In the case of I22, it seems that thermosensitive phenotype is due to mutations, however, other experiments should be done to confirm this.
5. All the identified mutations are found in armadillos replay zone, this suggests that loss of KapA function is expressed reading and binding cargoes NLS sequences.

7. Bibliografia

- [1] **Pontecorvo G., Roper J. A., Hemmons L. M., Macdonald K. D., eta Bufton A. W. J.** (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**: 141-238.
- [2] **Galagan J. E., Calvo S. E., Cuomo C., Ma L. J., Wortman J. R., Batzoglou S., et al.** (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438** (7071): 1105-1115.
- [3] **Harris S. D., Read N.D., Roberson R.W., Shaw B., Seiler S., Plamann M, eta Momany M.** (2005) Polarisome meets spitzenkorper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryotic Cell* **4**: 225-229.
- [4] **Yu J. H., Mah J. H., eta Seo J. A.** (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryotic Cell* **5** (10): 1577-1584.
- [5] **Casselton L, eta Zolan M.** (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Review Genetics* **3**: 683-697.
- [6] **Timberlake W. E.** (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 5-36.
- [7] **Adams T. H., Wieser J. K., eta Yu J. H.** (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (1): 35-54.
- [8] **Mims C. W., Richardson E. A., eta Timberlake W. E.** (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **144**: 132-141.
- [9] **Poon I. K. H., eta Jans D. A.** (2005) Regulation of nuclear transport: Central role in developmental and transformation? *Blackwell Munksgaard* **6**: 173-186.

- [10] **Otamendi A., Perez de Nanclares Arregi E., Oiartzabal Arano E., Cortese M. S., Espeso E. A., eta Etxebeste O.** (2019) Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- [11] **Herrero Garcia E., Perez de Nanclares Arregi E., Cortes M. S., Markina Iñarrairaegui A., Oiartzabal Arano E., Etxebeste O., Ugalde U., eta Espeso E. A.** (2015) Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Molecular Microbiology* **98** (4): 607-624.
- [12] **Etxebeste O., Herrero Garcia E., Araujo Bazan L., Rodriguez Urrea A. B., Garzia A., Ugalde U., eta Espeso E. A.** (2009) The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **73** (5): 775-789.
- [13] **Etxebeste O., Villarino M., Markina Iñarrairaegui A., Araújo Bazán L., eta Espeso E. A.** (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *Plos One* **8** (12).
- [14] **Kim Y. J., Yu. Y. M., eta Maeng P. J.** (2017) Differential control of asexual development and sterigmatocystin biosynthesis by a novel regulator in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports* **7** (1).
- [15] **Oiartzabal Arano E., Perez de Nanclares Arregi E., Espeso E. A., eta Etxebeste O.** (2015) Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **62** (2): 371-377.
- [16] **Etxebeste O., Ni M., Garzia A., Kwon N. J., Fischer R., Yu J. H., Espeso E.A., eta Ugalde U.** (2008). Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7** (1): 38-48.

- [17] **Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G., eta Kuriyan J.** (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* **94**: 193-204.
- [18] **Araújo L. B.** (2008) Análisis de las principales rutas de importación y exportación nuclear en *Aspergillus nidulans* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- [19] **Markina Iñarrairaegui A., Etxebeste O., Herrero-Garcia E., Araujo-Bazan L., Fernandez-Martinez L., Flores J. A., eta Espeso E. A.** (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* **22 (20)**: 3874-3886.