



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

KIMIKA FAKULTATEA  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco**

**Kimika Fakultatea/ Facultad de Química**

***Kimikako Gradua***

**2021-2022 ikasturtea**

**GRADU AMAIERAKO LANA**

*Aspergillus nidulans* ONDDOAREN GARAPENAREN KONTROL  
GENETIKOAN PARTE HARTZEN DUTEN PROTEINEN  
EZAUGARRITZE FUNTZIONALA

**Egilea:** Ane Fagoaga Izquierdo

**Zuzendaria:** Oier Etxebeste Juarez

Donostia, 2022ko iraila.



## LABURPENA

Harizpi itxurako onddoen artean, *Aspergillus* da gehien ikertu den generoetako bat, honen espezie batzuek medikuntzan eta industrian duten garrantziagatik eta beste batzuen izaera patogenoagatik. *Aspergillus nidulans* espeziea genero honen barnean kokatzen da, eta modelo organismo nagusietako bat da harizpi itxurako onddoen ugalketa asexuala kontrolatzen duten bide molekular eta genetikoan azterketan. Gradu amaierako lan honetan, *A. nidulans* onddoaren garapen asexualaren kontrol genetikoan parte hartzen duten gene/proteina berrien azterketa eta ezaugarritzea burutu da. Aurreko lanetan, FLIP57 fenotipo akonidialaren erantzule zen mutazioa *AN10640* genean zegoela zehaztu zen eta honek kodetzen duen FlpA ustezko ziklina identifikatu zen. FlpA-k, Stk47 ziklina-menpeko kinasarekin (CDK) eta hauen arteko zubi lana egiten duen FlpB proteinarekin CTDK-1 motako konplexua osatzen duela uste da. Konplexu honek RNA Polimerasa II-ren (geneen transkripzioa kontrolatzen duena) aktibitatearen erregulazioan parte hartuko luke, honen azpiunitate nagusiaren C-terminal eremua (CTD) fosforilatuz. Lan honetan, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen eta osa lezaketan konplexuaren egiturak eta funtzioak determinatzen saiatzeaz gainera, hiru proteina hauen arteko elkarreraginak eta menpekotasun funtzionalak aztertu dira, ustezko konplexuaren mekanismoak sakonago ulertzeko helburuarekin. Horrela, FlpA, Stk47 eta FlpB-k osatzen duten eta transkripzio prozesuan parte hartzen duen konplexuak *A. nidulans*-en garapen asexualaren kontrolean duen eragina ikusi da.

## ABSTRACT

The genus *Aspergillus* is one of the most studied genera among filamentous fungi due to the medical and industrial importance of some of its species and the pathogenic nature of some other species. *Aspergillus nidulans* is one of the main reference species for the study of the molecular and genetic pathways controlling asexual reproduction of filamentous fungi. This undergraduate thesis studies the new genes/proteins taking part in the genetic control of the asexual development in *A. nidulans*. In previous studies, a mutation in the gene *AN10640* was identified as the cause of the FLIP57 aconidial phenotype and the putative cyclin FlpA coded by *AN10640* was identified. In addition, studies suggest that FlpA interacts with the putative cyclin-dependent kinase (CDK) Stk47 and a third protein that acts as a bridge between the former two called FlpB to form a CTDK-1 type complex. This complex regulates in eukaryotes RNA Pol II activity by phosphorylation of the carboxy-terminal domain (CTD) of its large subunit. The present work intends not only to infer the structures and determine the functions of FlpA, Stk47 and FlpB but also to study the functional dependencies among the three proteins with the aim of a better understanding of the mechanisms of this putative complex. This way, the effect this CTDK-1 type complex (that takes part in the transcription process) has on the regulation of asexual development in *A. nidulans* has been observed.

## AURKIBIDEA

SARRERA.....	1
Onddoen erreinua eta harizpi itxurako onddoak.....	1
<i>Aspergillus</i> generoa .....	1
<i>Aspergillus nidulans</i> onddoaren hazkuntza eta ugalketa prozesuak .....	2
<i>Aspergillus nidulans</i> -en garapen asexualaren kontrol genetikoa.....	3
<i>Aspergillus nidulans</i> -en FLIP mutanteak .....	5
Ziklina-kinasa konplexu transkripzionalak .....	6
HELBURUAK .....	9
MATERIAL ETA METODOAK.....	11
Erabilitako anduiak.....	11
Erabilitako kultibo-medio eta disoluzioen prestaketa .....	12
Proteinen egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena.....	15
<i>Aspergillus nidulans</i> -en andui errekonbinanteen sorrera.....	15
DNA konstrukzioen sintesia fusio-PCR bidez.....	16
Protoplastoen transformazioa DNA konstrukzioekin .....	18
Diagonosi-PCR-ak.....	21
Proteinen kokapen zelularren azterketa fluoreszentsia mikroskopia bidez.....	22
Proteinen erauzketa.....	23
Proteinen Western-Blot bidezko immunodetekzioa.....	27
Laginen preskaketa .....	27
Elektroforesia .....	27
Proteinen transferentzia mintzera .....	29
Immunodetekzioa .....	29
Kontrolak.....	31
Fosfatasa alkalinoaren froga .....	32
EMAITZAK .....	33
1. FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek <i>S. pombe</i> -ren Ctk1, Ctk2 eta Ctk3 proteinek osatzen duten CTDK-1 motako konplexuaren parekoa osatuko lukete CollabFold adimen artifizialaren arabera.....	33
2. Stk47 ziklina menpeko kinasaren kokapen zelularra FlpA ziklinaren menpekoa da, honen gabezia kokapen nuklearra galtzen duelarik.....	35
3. Stk47 proteinen immunodetekzio banden patroia aldatu egiten da FlpA zein FlpB-ren gabeziarekin.....	39
EZTABAIDA.....	45
FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen ustezko funtzioa, osa lezaketen konplexua eta elkarren arteko menpekotasuna.....	45

RNA Pol II-ren CTD-ren fosforilazioaren garrantzia transkripzioaren kontrolean .....	46
ONDORIOAK.....	49
CONCLUSIONS.....	49
BIBLIOGRAFIA .....	51
ERANSKINAK.....	55

## SARRERA

### **Onddoen erreinua eta harizpi itxurako onddoak**

Onddoen erreinua, kolore, tamaina eta itxura ezberdineko organismo zelulabakar eta zelulanitzez osatuta dago (Petersen, 2013). Organismo hauek eginbehar garrantzitsua dute ingurunearen kontserbazioan. Hala nola, materia organikoaren deskonposizioan parte hartzen dute eta prokariota, landare eta animaliekin harreman sinbiotikoak osatzen dituzte (Galagan et al., 2005).

Onddoen erreinuko talde nagusien artean, harizpi itxurako onddoak aurkitzen dira. Organismo hauek oso erabiliak dira prozesu industrial eta bioteknologikoetan, hainbat antibiotiko eta entzimaren sintesian, besteak beste (Grimm et al., 2005). Hala ere, mota honetako onddoak patogeno fungiko arriskutsuak ere badira, substratu ezberdinetan modu azkar eta eraginkorrean hazten baitira. Horri gehitu egin behar zaio haien genomek substratu berrietara barreiatzeko eta inguruneko aldaketei azkar erantzuteko informazioa ere kodetzen dutela (Adams et al., 1998).

Harizpi itxurako onddoen zelula mota bereizgarriak hifak dira (Otamendi et al., 2019). Hauek egitura tubularrak dira eta modu polarizatuan hazten dira, punta izeneko eremuaren estentsio bidez. Norantza bakarreko elongazio hau emateko, mintz plasmatikoa eta pareta zelularra osatzeko beharrezkoak diren osagaiak puntara garraiatzen dira (garraio akropetal deiturikoa) (Etxebeste eta Espeso, 2019). Hifek, gainera, euren hazkuntza norantza alda dezakete inguruneko estimulu desberdinen aurrean (Otamendi et al., 2019). Adarkatzeak ere osa ditzakete, mizelio izeneko egitura konplexuak osatuz eta, modu honetan, norantza gehiagotan zabaltzeko gaitasuna eskuratuz (Oiartzabal-Arano et al., 2016).

### ***Aspergillus* generoa**

Harizpi itxurako onddoen artean, *Aspergillus* generoa aurkitzen da (*Ascomycetes* filumaren, *Eurotiomycetes* klasearen eta *Asprgillaceae* familiaren barnean) (Etxebeste eta Espeso, 2019). Hau, harizpi itxurako onddoen artean gehien ikertu den generoetako bat da, honen zenbait espeziek medikuntzan eta industrian duten garrantziagatik. Orain arte, 350 espezie inguru identifikatu dira

generoaren barruan. Hauek nitxo ezberdin ugaritan hazi daitezke eta batzuk gai dira animalia edo landare ostalariak ere kolonizatzeko (de Vries et al., 2017).

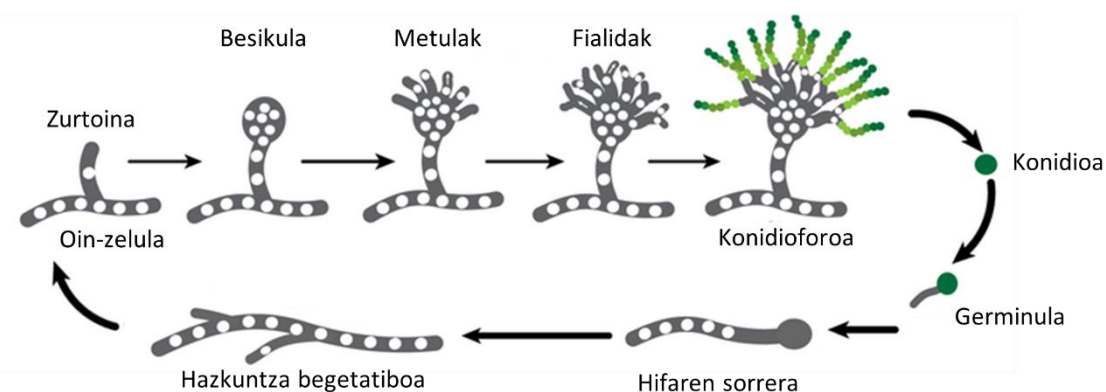
Genero honetako zenbait espezie animalia zein gizakien patogenoak dira. Laborategi mailan, patogeno izaera horrek eragingo lukeen segurtasun neurri zorrotzen beharra dela eta, hainbat modelo organismo erabili izan dira onddo hauen prozesu zelularrak aztertzeko. Hauen artean, *Aspergillus nidulans* espeziea nagusitzen da. Organismo hau bereziki erabilgarria da konidiazioa (garapen asexuala; ikus aurrerago) makroskopikoki erraz aztertzeko eta mutanteak modu sinplean lortzeko aukera ematen baitu (Adams et al., 1998). Gainera, bere ugalketa zikloak, sexuala eta asexuala, laborategi mailan erreproduzigarriak izateak esperimentu genetikoak anitz errazten ditu (Etxebeste eta Espeso, 2019). *Aspergillus nidulans* onddoaren hifek nukleo ugari dituzte puntatik eremu distalera era ia erabat erregularrean banatuta (Bat-Ochir et al., 2016; Oiartzabal-Arano et al., 2016). Nukleo hauek guztiek zitoplasmatik eta bertako organuluetatik informazioa jasotzen dute seinalizazioan parte hartzen duten proteinei esker (Bat-Ochir et al., 2016; Oiartzabal-Arano et al., 2016).

### ***Aspergillus nidulans* onddoaren hazkuntza eta ugalketa prozesuak**

*Aspergillus* generoko onddo gehienek ugalketa asexuala burutzen dute, konidio izeneko espora asexualak sortuz. Ugalketa sexuala burutzen duten onddoetan, ugalketa homotalikoa (organismo berean autoernalkuntza ematen denean) edo heterotalikoa (bi organismo bateragarriren arteko gurutzapena) eman daiteke (Varga et al., 2014). *Aspergillus nidulans* espezie homotalikoa nabarmenki erabilia izan da ugalketa sexuala eta asexualaren ikerketan (Ojeda-López et al., 2018). Ugalketa sexuala meiosian oinarritzen da, eta trukaketa genetikoak ematen da genetikoki desberdinak diren esporak ekoiztuz (*A. nidulans*-en kasuan genetikoki berdinak diren bi kolonia ere elkar gurutzatu daitezke). Garapen asexualan, aldiz, elkarren artean genetikoki berdinak diren milioika espora sortzen dira. Espora asexualak espora mitotikoak dira eta onddoen barreiatze-mekanismo nagusia dira (Otamendi et al., 2019).

*Aspergillus nidulans* onddoan, ugalketa asexualaren aurretik hazkuntza begetatiboa ematen da, hifek hazkuntza periodo minimo bat behar baitute garapen

asexuala, konidiazio izenez ere ezagutzen dena, hasteko gai izan daitezten (Adams et al., 1998). Hazkuntza begetatiboa esporen ernamuntzearekin hasten da, germinula izeneko egitura tubular bat sortuz (Adams et al., 1998). Germinula hori, era polarizatuan haziz, hifa bihurtzen da (1go irudia). Hifek, hazten eta adarkatzen jarraitu ahala, mizelio izeneko egitura multizelular hirudimentsionalak osatzen dituzte (Nguyen et al., 2017). Mizelioaren azken helburua substratu baten kolonizazioa edota nutrienteen bilaketa da. Kanpo (argia, airea edota estres egoera) zein barne (metabolitoak) estimuluek garapen asexuala eragin dezakete (Etxebeste et al., 2010; Rodríguez-Urra et al., 2012), konidioforo izeneko egiturak sortuz (ikus 1go irudia). Konidioforo bakoitzak konidio deituriko milaka espora asexual sortzen ditu (Oartzabal-Arano et al., 2016).



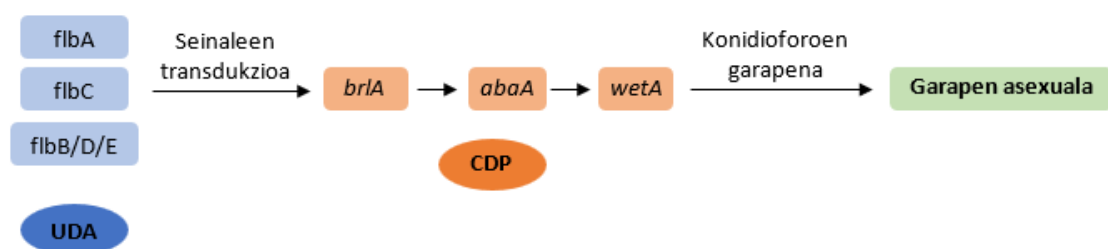
**1go irudia.** Konidioforoaren garapen prozesuaren urratsak azaltzen dituen eskema. Espora edo konidioaren ernamuntzearekin (eskuinean), germinula izeneko egitura tubularra sortzen da. Hau era polarizatuan hazten da, eta adarkatu ere egiten da, hifa bihurtuz. Hifaren hazkuntza begetatiboa eten ondotik, oin-zelula deituriko pareta lodiko zelula bat osatzen da puntatik urruti dagoen eremuan (Oartzabal-Arano et al., 2016). Oin-zelulak konidioforoaren euskarri funtzioa egiten du. Bertatik zurtoina hazten hasten da, besikula osatu arte. Besikularen kupulan metula izeneko egiturak sortzen dira. Hauek era polarizatuan hazten dira tarte labur batez, ondoren bakoitzak bi fialida eratzeko. Azken hauek konidio kate luzeak sortzen dituzte. Ingurune baldintzek hala eskatzen dutenean, ondoak ekoiztutako konidio edo esporak substratu berrietara zabaltzen dira. Horrela, zikloa itxi egiten da. (Bayram *et al.*, (2010) lanetik moldatutako irudia).

### ***Aspergillus nidulans*-en garapen asexualaren kontrol genetikoa**

Aurretik azaldutako aldaketa morfologikoak genetikoki erregulatuak daude. Bi bide genetikoko/molekular nagusi deskribatu dira (ikus 2. irudia) (Otamendi et al., 2019). Konidioforoaren eta espora asexualen sintesia, CDP (*Central developmental pathway*) bideko geneek kontrolatzen dute (Adams et al., 1998). *brlA* CDP bidearen



lehen genea da. Hainbat transkripzio faktore (TF) gene honen promotoreari (DNAn proteina kodetzen duen sekuentziaren aurretik dagoen eremua, zeini proteinak lotzen zaizkion RNArako transkripzioa hasteko) lotzen zaizkio, arestian aipatutako kanpo eta barne estimuluen arabera, eta seinaleen transdukzio bidez (seinale kimiko edo fisiko bat zelulara helarazteko prozesua, gehienetan proteinen fosforilazio bidez, zelularen erantzun bat eragiten duena), konidiazioa aktibatu edo inhibituz. *wetA* eta *abaA* geneak ere CDP bidearen erregulatzailerak dira eta, *brlA*-rekin batera, konidiazioari lotutako geneen adierazpena eta aktibazioa kontrolatzen dute konidioforoek garapenean (Boylan et al., 1987). *abaA* geneak erregulatzailerak bat kodetzen du, *brlA*-k aktibatzen duena konidioforoek garapenean erdiko faseetan (Andrianopoulos eta Timberlake, 1991). *wetA*, ordea, garapenean fase aurreratuetan beharrezkoa da pareta zelularren osagaien sintesirako (Marshall eta Timberlake, 1991). Konidiazioa inguruneke eta zelula barneko baldintzen menpe dagoen prozesu bat denez, UDA (*Upstream developmental activation*) bidea da estimulu horiei dagokien informazioa *brlA*-ren promotorera modu egokian transduzitzen dela ziurtatzeaz arduratzen dena, konidiazioa emango den ala ez erabakiz (Oiertzabal-Arano et al., 2016; Etxebeste et al., 2010). UDA bide honetan, FlbB, FlbC eta FlbD dira orain arte identifikatu eta ezaugarritu diren transkripzio faktore nagusiak. Hauek *brlA*-ren promotorean sekuentzia espezifikoak ezagutu eta lotzen dituzte, gene honen espresioa eta konidiazioa kontrolatuz (Etxebeste et al., 2010). Edonola, ez dira hauek *brlA*-ren adierazpena kontrolatzen duten TF bakarrak.



**2. irudia.** *Aspergillus nidulans* onddoaren garapen asexuala kontrolatzen duten bide genetikoaren eskema sinplifikatua. Hazkuntza begetatibotik konidiazio prozesura ematen diren aldaketa morfologikoak bi bide molekularren bidez erregulatuak daude. UDA (*Upstream developmental activation*) bidea seinaleen transdukzioaz arduratzen da eta, inguruneke baldintzen arabera, konidiazioa emango den ala ez erabakitzen du (Oiertzabal-Arano et al., 2016). Bide genetiko honek *brlA* genearen espresioa kontrolatzen du

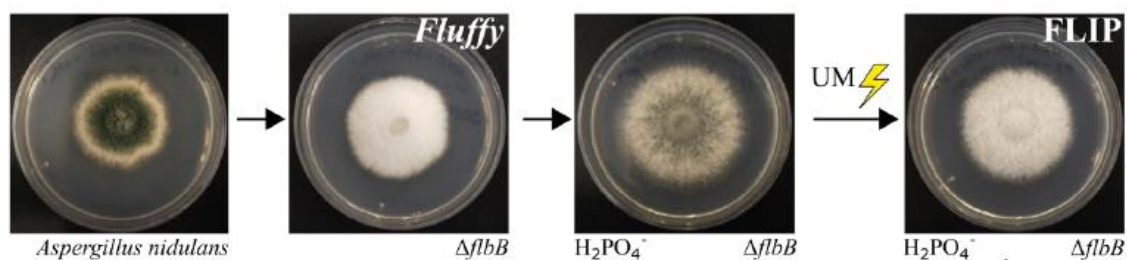
(Otamendi et al., 2019). *brlA* genea (irudian laranjaz) CDP (*Central developmental pathway*) bideko lehen genea da. UDA bidea, gutxienez, hiru azpibidez osatuta dago, *flbA*, *flbC* eta *flbB/D/E* geneek definitutakoak, hain zuzen ere (irudian urdinez). FlbB, FlbC eta FlbD UDA bideko transkripzio faktoreak (TF) dira eta *brlA*-ren promotorea lotzen dute, gene honen espresioa kontrolatuz. BrlA-k, aldi berean, CDP bidearen gainontzeko geneen aktibazioan parte hartzen du, garapen asexualerako ezinbestekoa dena. Izan ere, CDP bide molekularrak konidioforoaren garapena kontrolatzen du hainbat mekanismo erregulatzaileraren bidez (Oartzabal-Arano et al., 2016). *abaA* eta *wetA* CDP bideko erregulatzaile nagusiak dira eta konidiazio prozesuaren kontrolean parte hartzen dute (Boylan et al., 1987).

FlbB, *brlA* genearen promotorea lotzen duen eta haren transkripzioa kontrolatzen duen bZIP motako UDA bideko TF bat da. Konidiazioaren indukzioarako beharrezkoa da, beraz. Proteina hau hifen puntan kokatzen da, hifen hazkuntza lekuan, hain zuzen. Izatez, harizpi itxurako ondoetan, kokapen apikala (hifen puntan) duela deskribatu den lehen TFa da FlbB (Etxebeste et al., 2008). Hifen puntako kokapen hau FlbE deituriko beste UDA proteina baten menpekota da (Garzia et al., 2009). Aurreko lanetan, FlbB-ren kokapen apikala *brlA*-ren espresioaren kontrolerako bete beharreko baldintza dela ikusi da (Herrero-Garcia et al., 2015). FlbB eta FlbD-ren aktibitate erregulatzailea, aldi berean, elkarren menpekota da. Lehenak *flbD*-ren espresioa kontrolatzen du, baina ezin du *brlA*-ren promotorea lotu FlbD-ren gabezia (Etxebeste et al., 2010).

### ***Aspergillus nidulans*-en FLIP mutanteak**

*brlA* genean proteinaren funtzio galera eragiten duen mutaziorik egonez gero, kotoi itxurako koloniak osatzen dira. Horregatik, erabat akonidiala den fenotipo honi *fluffy* deritzo (Adams et al., 1998). UDA bideko geneen delezioak edo funtzio galera eragiten duten mutazioek ere *fluffy* fenotipoa eragiten dute, baina kasu honetan fenotipoa ez da erabat akonidiala. Konidiazioa atzeratua dago, kasu honetan, eta konidioforo kopuruan ere murrizketa esanguratsua gertatzen da (Adams et al., 1994; Etxebeste et al., 2009).

Honen adibide bat  $\Delta flbB$  mutantea da, genomatik *flbB* genea ezabatzean sortua. Hazkuntza-medio estandarrean,  $\Delta flbB$  mutanteak *fluffy* fenotipoa du (3. irudia). Estres egoera jakinen aurrean ( $H_2PO_4$ -rekin aberastutako kultibo medio batean, esaterako), ordea, fenotipo akonidiala atzera itzuli eta garapen asexuala burutzeko gai da (Etxebeste et al., 2009; Otamendi et al., 2019).



**3. irudia.** Ezkerrean, *Aspergillus nidulans*-en andui basati baten fenotipoa. Bigarren irudian,  $\Delta flbB$  mutantearen *fluffy* fenotipo akonidiala AMM medioan. Hau atzera itzultzen da  $H_2PO_4^-$ -dun (> 0.5 M) AMM medioan (hirugarren irudia). (Otamendi et al., 2019) lanean isolatutako FLIP (*fluffly in phosphate*) mutanteek, ordea, fenotipo akonidiala erakusten jarraitzen dute fosfatodun medioan (eskuinean). (Agirrezabala, 2021) MAL-ean, fenotipo horren eragilea zen mutazioa identifikatu zen. ((Agirrezabala, 2021) MAL-etik eskuratutako irudia).

Otamendi *et al.*, (2019) lanean,  $\Delta flbB$  fondo genetikodun anduiaren konidioak UV (ultramore) argiaz mutagenizatu ziren,  $NaH_2PO_4$  (> 0.5M) zuen AMM kultibo medioan fenotipo akonidiala erakusten jarraitzen zuten mutanteak (3. irudia) isolatu eta haiekin bilduma bat osatzeko. Mutante horiei FLIP (*fluffly in phosphate*) ezizena eman zitzaion. (Agirrezabala, 2021) master amaierako lanean, FLIP57 andui mutantearen azterketa burutu zen, eta fenotipo horren eragile zen mutazioa identifikatu zen V. kromosomako *AN10640* genean. Gene hau *flpA* moduan izendatu zen (*fluffly in phosphate A*). FLIP57 mutantearen *AN10640/flpA* genean aurkitutako mutazioak Gly347Stop aldaketa eragingo luke proteinan. Proteinak 392 aminoazido edukita, mutazioak azken 45 aminoazidoen galera eragingo luke. MAL horretan ere, *flpA* gene osoaren delezioak konidioforoen morfologian kalteak eragiten zituela ikusi zen, metula-fialida trantsizioa ez baitzen modu egokian gertatzen.

### Ziklina-kinasa konplexu transkripzionalak

FlpA proteina ziklina bat izan zitekeela erakusten zuten proteinen funtzioa aurreikusten duten InterPro bezalako datu baseek. Ziklinek, ziklina menpeko kinasekin (CDK; *Cyclin dependent kinases*) konplexuak osatzen dituzte, fosforilazio/desfosforilazio prozesuen bidez erregulatuak daudenak (Lees, 1995). CDK batzuek ziklo zelularraren kontrolean parte hartzen dute. Baina badaude ere ziklo zelularraren kontrolarekin zerikusirik ez duten funtzioak burutu ditzaketen ziklina menpeko kinasak. Esaterako, batzuek RNA Polimerasa II (Pol II) konplexuaren aktibitatea erregulatzen dute. Transkripzioan dute hauek, beraz, funtzio nagusia, alegia DNAtik RNArako sintesian (Xie et al., 2021). Ziklina-kinasa

konplexu transkripzionalak RNA Pol II konplexuaren azpiunitate nagusia den Rpb1-en C-terminal eremua fosforilatzen dute. Rpb1-en CTD (*Carboxy-terminal domain*) eremua hainbat alditan errepikatzen den heptapeptido batez osatua dago: Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>.

*Schizosaccharomyces pombe* espeziean, RNA Pol II konplexuaren Rpb1-en CTD-ren heptadetan Ser2 aminoazidoaren fosforilazioa burutuko luke CTDK-I ziklina-kinasa konplexuak. CTDK-1 konplexua hiru azpiunitatez osatua dago *S. pombe*-n: Ctk1 kinasa azpiunitatea ( $\alpha$ ), Ctk2 ziklina azpiunitatea ( $\beta$ ), eta bien arteko zubi lana egiten duen Ctk3 azpiunitatea ( $\gamma$ ) (Lee et al., 1995; Xie et al., 2021).

FlpA proteina *S. pombe*-n Ctk2 proteinaren ortologoa (ortologoak espezie desberdinetan aurkitzen diren sekuentzia homologodun geneak dira, amankomuneko azken arbasoaren gene batetik eratorriak) izanik, Ctk1 eta Ctk3-ren ortologekin *A. nidulans*-en CTDK-I konplexua osa zezakeela pentsatu zen, Ctk2 proteinak Ctk1 eta Ctk3 azpiunitateekin egiten duen antzera. Hau horrela, *A. nidulans* espeziean, *S. pombe*-ren Ctk1 eta Ctk3 proteinen ortologoak ziren Stk47 (AN8190) eta FlpB (AN6312) proteinak identifikatu ziren BLAST algoritmoa erabiliz. (Agirrezabala, 2021) MAL-ean, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek transkripzioa erregulatzen zutela proposatu zen, RNA polimerasa II konplexuaren azpiunitate nagusiaren aktibazio eta desaktibazioz.

Gradu amaierako lan honetan, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen azterketa bioinformatikoarekin jarraitu da, hauen ustezko funtzioak eta elkarren arteko menpekotasun funtzionalak sakonago ulertzeko helburuarekin. Lehenik eta behin, egitura hirudimentsionalak proteinen funtzioarekin duen lotura estua dela eta, aipaturiko hiru proteinen eta hauek osa lezaketan konplexuaren egiturak aurreikusi dira. Jarraian, proteina bakoitzaren kokapen nuklearra behatu da fluoreszentsia mikroskopia bidez fondo genetiko basatian, baita beste bi proteinen gabezia ere. Azkenik, Western-Blot bidezko immunoprobak burutu dira FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen espresioa aztertzeko andui desberdinetan.



## HELBURUAK

*A. nidulans* onddoaren garrantzia ikusita harizpi itxurako onddoen garapen asexualaren ikerketan, eta dagoeneko honen garapen genetikoa kontrolatzen duten gene edo proteina posibleak identifikatu izanik (FLIP57 mutantearen azterketa bioinformatikoan), hauen azterketa genetikoarekin jarraitzea erabaki da, onddoen garapen mekanismoak eta proteina hauen parte hartzea sakonago ulertu ahal izateko. Horrela, Gradu amaierako lan honetan, hurrengo helburuak proposatu dira:

- Aurretik identifikaturiko FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek elkarrekin osatuko luketen konplexuaren egitura hirudimentsionala aurreikustea, proteina hauei buruzko informazio funtzionala eskuratzeko.
- FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen kokapen zelularra aztertzea, nukleoan kokatzerako orduan elkarren artean eduki ditzaketen menpekotasun funtzionalak identifikatzeko.
- Interesko hiru proteinen immunodetekzio probak burutzea, hauetako baten gabeziak besteen espresioan izan dezakeen eragina behatzeko.



## MATERIAL ETA METODOAK

### Erabilitako anduiak

Gradu amaierako lan honetan erabilitako anduien genotipoak 1go Taulan daude jasoak. Andui gehienak Ziortza Agirrezabalaren GrAL eta MAL lanetan sortu ziren. BD1503-BD1508 anduiak, ordea, lan honetan sortu ziren GrAL honen zuzendariarekin batera.

Anduia	Genotipoa	Iturria
BD1442 BD1443	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; flpA<sup>p</sup>::gpdA<sup>p</sup>::flpA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1448 BD1449	<i>pyrG89; stk47::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1451 BD1452	<i>pyrG89; stk47::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1458	<i>pyrG89, flpB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1464 BD1466	<i>pyrG89; stk47::gfp::pyroA<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔflpA::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1468 BD1469	<i>pyrG89, flpB::gfp::pyroA<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔflpA::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1477 BD1479	<i>pyrG89, ΔflpB::pyrG<sup>Afum</sup>; stk47::gfp::pyroA<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1482 BD1484 BD1485 BD1486	<i>pyrG89, ΔflpB::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; flpA<sup>p</sup>::gpdA<sup>p</sup>::flpA::gfp::pyroA<sup>Afum</sup>; veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1493 BD1494	<i>pyrG89; Δstk47::riboB<sup>Afum</sup>; argB2; pabaB22; ΔnkuA::argB; flpA<sup>p</sup>::gpdA<sup>p</sup>::flpA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; riboB2, veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1495 BD1496	<i>pyrG89, ΔflpB::pyrG<sup>Afum</sup>; Δstk47::riboB<sup>Afum</sup>; argB2; pabaB22; ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	(Agirrezabala, 2021)
BD1503 BD1504 BD1505	<i>pyrG89; stk47::ha<sub>3x</sub>::pyrG; ΔnkuA::argB; argB2; pyroA4; ΔflpA::pyroA; veA1</i>	Lan hau
BD1506 BD1507 BD1508	<i>pyrG89; stk47::ha<sub>3x</sub>::pyrG; ΔnkuA::argB; argB2; pyroA4; ΔflpB::pyroA; veA1</i>	Lan hau

**1go Taula.** Lan honetan erabilitako anduiak, haien genotipoak eta iturria

Erabilitako andui gehienak aurretik sortuta zeuden (ikus 1go taula). Stk47::HA<sub>3x</sub> kimera ΔflpA (BD1503, BD1504 eta BD1505 anduiak) eta ΔflpB



(BD1506, BD1507 eta BD1508 anduiak) fondo genetiko nulueta adierazten zuten anduiak, ordea, lan honetan sortu ziren, aurrerago azalduko den prozedura jarraituz.

### Erabilitako kultibo-medio eta disoluzioen prestaketa

*Aspergillus nidulans*-en hazkuntzarako kultibo medio desberdinak prestatu ziren (2, 3 eta 4. Taulak). AMM (*Aspergillus* medio minimoa) prestatu zen anduiak petri plaketan hazteko (medio solidoa). AFM (*Aspergillus* fermentazio medioa) erabili zen esporak hazten jartzeko (medio likidoa) proteina erauzketak egin baino lehen. Horrez gain, WMM (*Watch minimal medium*) kultibo medioa erabili zen fluoreszentzia mikroskopiarako laginak inokulatzeko.

Kultibo medioa	Osagaiak (litroko)
<b>AMM (I)</b> <b>(<i>Aspergillus</i> medio minimo likidoa)</b>	20 mL gatz eta traza elementuen disoluziotik (3. Taula) pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz 15 g agar gehitu Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min); 100 mL (10x) glukosa disoluziotik (%2) (3. Taula) 10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) + kasuan kasuko elikagai osagarriak (4. Taula)
<b>AFM (I)</b> <b>(<i>Aspergillus</i> fermentazio medio likidoa)</b>	20 mL gatz eta traza elementuen disoluziotik (3. Taula) 25 g Corn Step Liquor (CSL) (Sigma) Ura gehitu, irabiatu eta Büchner-ean filtratu huspean pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min); 100 mL (10x) sakarosa disoluziotik (%30) (3. Taula) 10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) + kasuan kasuko elikagai osagarriak (4. Taula)
<b>WMM</b> <b>(<i>Watch minimal medium</i>)</b>	1 mL (1000x) traza elementuen disoluziotik (3. Taula) 0.5 g KCl (17 mM) 0.5 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (5 mM) pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min); 5 mL (5M) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> disoluziotik (25 mM) 5 mL (10x) glukosa disoluziotik (%0.1 p/v) (3. Taula) 10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) (3. Taula)
<b>MMR</b>	AMM (I) 342 g sakarosa (1M)

	<p>15 g agar bakteriologiko  pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz  Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)  5 mL (5M) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> disoluziotik (25 mM)  5 mL (10x) glukosa disoluziotik (%0.1 p/v) (3. Taula)  10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) (3. taula)</p>
<p><b>MMR-TOP</b>  <b>(Birsortze TOP medioa)</b></p>	<p>AMM (l)  342 g sakarosa (1M)  6 g agar bakteriologiko  Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)  5 mL (5M) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> disoluziotik (25 mM)  5 mL (10x) glukosa disoluziotik (%0.1 p/v) (3. Taula)  10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) (3. Taula)</p>
<p><b>MCA</b>  <b>(Aspergillus medio solido osatua)</b></p>	<p>MMA (l)  5 g legami estraktu  15 g agar bakteriologiko  pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz  Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)  5 mL (5M) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> disoluziotik (25 mM)  5 mL (10x) glukosa disoluziotik (%0.1 p/v) (3. Taula)  10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) (3. Taula)</p>
<p><b>MCA (l)</b>  <b>(Aspergillus medio likido osatua)</b></p>	<p>MMA (l)  5g legami estraktu  pH-a doitu 6.8-ra NaOH-tan 4M den disoluzioa gehituz  Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)  5 mL (5M) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> disoluziotik (25 mM)  5 mL (10x) glukosa disoluziotik (%0.1 p/v) (3. Taula)  10 mL (100x) amonio tartrato disoluziotik (5 mM) (3. Taula)</p>

**2. Taula.** *Aspergillus nidulans*-en kultibo medioak eta hauen osagaiak.

Disoluzioa	Prestaketa
<p><b>Traza elementuen disoluzioa</b>  <b>(1000x)</b></p>	<p>22 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  11 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  5 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O  5 g FeSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  1.6 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  1.6 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O  1.1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O  50 g Na<sub>2</sub>EDTA  pH-a doitu 6.5-6.8-ra KOH erabiliz</p>

	Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Gatz eta traza elementuen disoluzioa (50x)</b>	26 g KCl 26 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 76 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mL traza elementuen disoluziotik (1000x) Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Glukosa %20 disoluzioa (10x)</b>	200 g glukosa Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Amonio tartrato 5 mM disoluzioa (100x)</b>	92 g amonio tartrato Ur distilatua 1 L arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Sakarosa %30 disoluzioa (10x)</b>	60 g sakarosa Ur distilatua 200mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)

**3. Taula.** Kultibo medioak prestatzeko erabilitako disoluzioak eta hauen osagaiak eta prestaketa.

<b>Elikagai osagarriak</b>	<b>Kultibo medioaren 100 mL-ko</b>
<b>Biotina (biA) (10<sup>4</sup>x)</b>	10 µL
<b>Piridoxina (pyro) (10<sup>3</sup>x)</b>	100 µL
<b>Azido p-aminobentzoikoa (paba) (10<sup>3</sup>x)</b>	100 µL
<b>Uridina</b>	0.122 g (pisatu eta zuzenean gehitu)
<b>Uraziloa</b>	0.056 g (pisatu eta zuzenean gehitu)

**4. Taula.** Hazkuntza medioei gehitutako elikagaiak anduien markatzaile genetikoaren (auxotrofiaren) arabera.

Anduiak 5.5 cm-ko diametroko petri plaketan hazten jarri ziren, karbono eta nitrogeno iturriak eta kasuan kasuko elikagai osagarriak zituen AMM kultibo medioan. Plaka bakoitzean 12.5 mL kultibo medio gehitu ziren, gutxi gora-behera, eta hauek lehortzen utzi ziren kanpian, medioa solidifikatu arte. Azkenik, UV erradiazioa erabili zen (10 min) kutsadurak ekiditeko.

Anduiak Ziortza Agirrezabalaren Master amaierako lanean (2021) gordetako *stock*-en laginak medio solidodun plaketan hazten jarriz freskatu ziren. Horretarako, ingurune esterilean espatularekin *stock*-etako esporak arraspatu eta

aurretik prestatutako plaketan zabaldu ziren. Anduiak inkubatzen utzi ziren 3-4 egunez, 37°C-tan.

Esporak hazteko, AFM medio likidoan inokulatu ziren, karbono eta nitrogeno iturriak eta kasuan kasuko elikagaiak gehituta zituena. UV erradiazioarekin desinfekzioa burutu ondotik, kalkulaturako espora bolumenak medio likidodun erlenmeyer-etan inokulatu ziren. Hauek 37 °C-tan inkubatu ziren 18 orduz.

### **Proteinen egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena**

FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen egitura hirudimentsionalen aurreikuspena egiteko, Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>; (Waterhouse et al., 2018)) plataforma erabili zen lehenik (Agirrezabala, 2021). Honek, intereseko proteinen egitura hirudimentsional posibleak proposatzen ditu, bere aminoazido sekuentzia datu basean gordeta dauden proteinen sekuentziekin konparatuz eta aurkitutako antzekotasunetan oinarrituz. Bigarrenik, hiru proteina horiek elkarren artean osatzen duten ustezko konplexuaren egitura hirudimentsionala, AlphaFold proteina-egitura datu-basearen bidez aurreikusi zen (Jumper et al., 2021). Hau, DeepMind eta EMBL-EBI-k garatutako adimen artifizialeko programa bat da, proteinen egitura hirudimentsionala aurreikusteko gai dena beraien aminoazido sekuentzietan soilik oinarrituz (Varadi et al., 2022). Tresna honetatik abiatuta, GrAL honetan CollabFold tresna erabili zen (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>), zeinak AlphaFold2 Multimer, proteina konplexuen egituraren aurreikuspenarako adimen artifiziala erabiltzen duen (Mirdita et al., 2022). Horrela, FlpA, Stk47 eta FlpB-ren sekuentziak edo sekuentzia zatiak (Stk47-ren kasuan ezin izan zen sekuentzia osorik sartu, muga 1000 aminoazidotan baitago) programan sartuz, hiru proteina hauek osa dezaketen konplexuaren aurreikuspena lortu zen. Lortutako egiturak UCSF Chimera 1.16 programa erabiliz aztertu ziren.

### ***Aspergillus nidulans*-en andui errekonbinanteen sorrera**

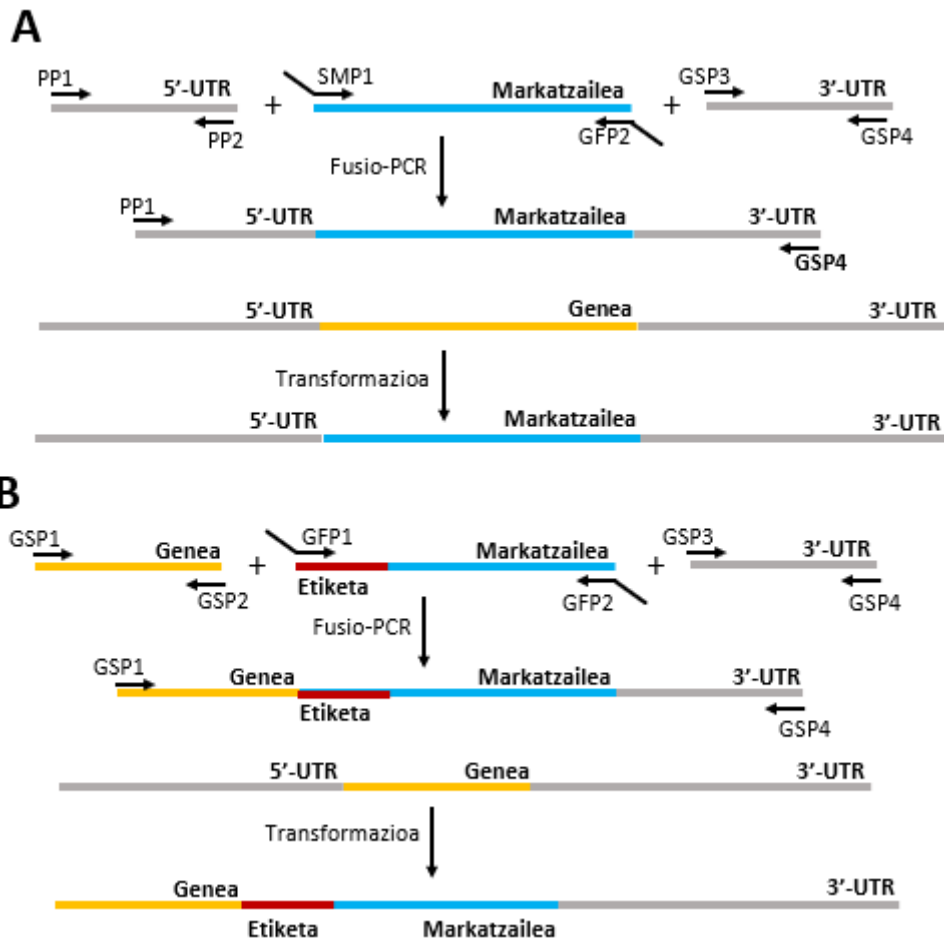
Atal honetan, *Aspergillus nidulans*-en andui errekonbinanteak nola lortu ziren azalduko da. Lehenik, DNA konstrukzioak sortu ziren. Jarraian, *Aspergillus nidulans*-en protoplastoak DNA konstrukzio horiekin transformatu ziren. Eta

azkenik, DNA-a erauzi eta diagnosi-PCR-ak burutu ziren DNA konstrukzio horiek genomak dagokien lekuan integratu zirela baieztatzeko.

#### *DNA konstrukzioen sintesia fusio-PCR bidez*

Transformaziorako erabili ziren DNA konstrukzioak fusio-PCR bidez sortu ziren (Lin et al., 2004). Hauek bi modura lortu ziren: gene osoaren delezioz, edo gene bati etiketa bat gehituz, gero proteinaren detekzioa ahalbidetuko duena.

Lehenengo kasuan (ikus 4A irudia), hiru DNA fragmentu amplifikatu ziren. Alde batetik, ordezkatu den genearen promotorea (5'-UTR eremua) amplifikatu zen, PP1 eta PP2 oligonukleotidoak eta DNA genomikoa moldetzat erabiliz. Gero, ezabatu nahi den genea ordezkatu duen selekzio markatzailea amplifikatu zen, SMP1 eta GFP2 oligonukleotidoak eta markatzailea daraman plasmidoa moldetzat erabiliz. Selekzio markatzailea transformazioaren ondoren kolonia transformanteen lehen selekzioa egiteko aukera emango duen genea da, zeinak gaitasun metaboliko bat ematen dion gene hori hartu duen anduiari. Azkenik, genearen terminadorea (3'-UTR eremua) amplifikatu zen, GSP3 eta GSP4 oligonukleotidoak eta DNA genomikoa erabiliz. Selekzio markatzailea amplifikatzeko erabilitako oligonukleotidoek fragmentu bana daramate, promotorearen azken nukleotidoen eta terminadorearen hasierako nukleotidoen osagarriak direnak. Behin hiru zatiak amplifikatuta, fusio-PCR bat burutu zen, PP1 eta GSP4 oligonukleotidoak eta lortutako hiru fragmentuak moldetzat erabiliz.



**4. irudia.** Transformazioan erabiliko ziren DNA konstrukzioen sintesia fusio-PCR bidez. **A. Gene osoaren deletzioa.** Kasu honetan, hiru zati anplifikatu ziren: genearen promotorea edo 5'-UTR eremua (PP1 eta PP2 oligonukleotidoak eta moldetzat DNA genomikoa erabiliz); genearen terminadorea edo 3'-UTR eremua (GSP3 eta GSP4 oligonukleotidoak eta moldetzat DNA genomikoa erabiliz); eta ordezkatu nahi den genea (GFP1 eta GFP2 oligonukleotidoak eta selekzio markatzailea daraman plasmidoa moldetzat erabiliz). Markatzailea anplifikatzeko erabilitako oligonukleotidoek nukleotido gehigarriak daramatzate ertzetan; ertzetako batean promotorearen azken nukleotidoen osagarriak daramatzate, eta bestean terminadorearen lehen nukleotidoen osagarriak. Hiru zatiak anplifikatu ostean, fusio-PCR bidez elkartu ziren, PP1 eta GSP4 oligonukleotidoak eta moldetzat lortutako hiru fragmentoak erabiliz. Azkenik, transformazioa burutu zen sortutako DNA konstrukzioarekin. **B. Etiketa bat gehitzea.** Genea etiketatzeko kasuan, hurrengo hiru zatiak anplifikatu ziren: genearen promotorea (PP1 eta PP2 oligonukleotidoak eta DNA genomikoa moldetzat erabiliz); terminadorea (GSP3 eta GSP4 oligonukleotidoak eta DNA genomikoa erabiliz); eta selekzio markatzailea (lan honetan *pyroA* erabili da BD1503-BD1508 anduiak sortzeko) etiketarekin (lan honetan *ha<sub>3x</sub> erabili da*) batera (GFP1 eta GFP2 oligonukleotidoak eta dagokion sekuentziadun plasmidoa moldetzat erabiliz). Jarraian, lortutako hiru zatiak moldetzat erabiliz, fusio-PCRa burutu zen, GSP1 eta GSP4 oligonukleotidoak erabiliz. Behin DNA konstrukzioak edukita, transformazioak burutu ziren.

Geneak etiketatzeko (fondo genetiko basati edo mutantean) (ikus 4B irudia), anplifikatutako hiru zatiak hurrengoak izan ziren. Batetik, genearen promotorea (PP1 eta PP2 oligonukleotidoekin) eta terminadorea (GSP3 eta GSP4 oligonukleotidoekin) anplifikatu ziren, bi kasuetan DNA genomikoa erabiliz molde gisara. Bestetik, selekzio markatzailea (lan honetan *pyroA* genea) gehitu nahi zen etiketarekin (lan honetan  $ha_{3x}$ ) batera anplifikatu zen (GFP1 eta GFP2 oligonukleotidoak eta dagokion sekuentzia duen plasmidoa molde bezala). Ondotik, hiru zatiak fusio-PCR bidez elkartu ziren, GSP1 eta GSP4 oligonukleotidoak erabiliz.

#### *Protoplastoen transformazioa DNA konstrukzioekin*

Transformazioa burutzeko, (Szewczyk et al., 2006) laneko protokoloa jarraitu zen eta 5. Taulan azaldutako disoluzioak erabili ziren. Lehenik eta behin, *Aspergillus nidulans*-en dagokion anduiaren protoplastoak (pareta zelularrik gabeko zelulak) lortu behar dira. Horretarako, andui parentalaren (transformatuko dena) esporak beharrezko nutrientez hornitutako MCA(I) kultibo medioaren 150 mL-tan inokulatu ziren. 37°C-tan 20 orduz inkubatu ondotik (irabiatuz 150 rpm-tan), mizelioa filtratu (Miracloth papera) eta garbitu zen, eta mizelioaren 1.25-1.5 g bildu ziren, gutxi gora-behera. Mizelio lagin hori, *Protoplasting solution* (ikus 5. Taula) eta andui parentalarentzat beharrezko nutrienteak zituen MCA medioaren 1:1 nahaste batean (32 mL) suspenditu ziren. *Protoplasting* disoluzioa VinotastePro (Novozymes) entzima nahasteaz osatuta dago (2.048g/16mL), eta honek hifen pareta zelularreko Glukano polisakaridoak liseritzen ditu. Nahastea 30 °C eta 100 rpm-tan inkubatu zen 90-120 minutuz eta, 90. minututik aurrera, 15 minuturo laginak hartu ziren, mikroskopia bidez nahikoa protoplasto zegoela ikusi zen arte.

Lortutako protoplastoen nahastea 16 mL-ko bi alikuotatan banatu zen eta bakoitza sakarosatzen 1.2M zen disoluzioaren bolumen berera gehitu zen, pipetarekin poliki-poliki, bi fase bereizteko. Hodiak 4 °C eta 4000 rpm-tan 10 minutuz zentrifugatu ondotik, protoplastoak interfasetik bildu ziren kontu handiz beste hodi batera. KCl-tan 0.6M zen disoluzio baten bolumen berarekin nahasi ondoren, aurreko baldintza beretan zentrifugatu zen. Gainjalkina kendu eta protoplastoak KCl-tan 0.6M zen disoluzioaren 2 mL-tan birsuspenditu ziren. Beste behin zentrifugatutakoan (3 min; 4000 rpm; giro-tenperatura), likidoa kendu eta beste bi

aldiz garbitu zen. Bukaeran, *pellet*-ari KCl (0.6M) + CaCl (50mM) nahastearen 0.5 mL gehitu zitzaizkion.

Jarraian, 100 µL-na protoplasto nahaste 50 mL-ko polipropilenoazko hodian banatu ziren, eta zegokien DNA konstrukzioen 10 µL gehitu zitzairen. Lagin bat DNA-rik gehitu gabe utzi zen, kontrol negatibo modura (ezingo zen transformanterik lortu). Gero, PEG6000 disoluzioaren (Sol. 8) 50 µL gehitu, eskuz nahasi, eta 20 minutuz izotzetan utzi ziren transformazio nahasteak. Hodiak giro tenperaturara ekarri ondotik, PEG6000 disoluzioaren mililitro bana gehitu zitzairen, eskuekin nahasiz. Bost minutuz giro tenperaturan eduki eta STC disoluzioaren (Sol. 7) 5 mL gehitu zitzairen, MMR-TOP medioaren 15 mL-rekin batera. Nahaste bakoitza hiru alikuotatan banatu eta adina Petri plakatan gehitu ziren. Hiru plaketako bik kultibo medio selektiboa zuten, hots, ez zuten selekzio markatzaileari dagokion nutrienterik. Plaka hauetan, soilik transformanteen hazkuntza eman beharko litzateke, selekzio markatzaileari esker kasuan kasuko nutrienteak ekoizteko ahalmena baitute, andui parentalek ez bezala. Hirugarren Petri plakak kultibo medio ez-selektiboa zuen, non kolonia transformanteak zein transformatu gabekoak hazi zitezkeen. Azken plaka hau kontrol bezala erabili zen. Plakak 37 °C-tan inkubatu ziren 72 orduz, transformanteak lortu arte.

Disoluzioak	Osagaiak
<b>Sol. 7 (STC) (100 mL)</b>	18.22 g sorbitol 1 mL TrisHCl (1 M; pH 7.5) 1 mL CaCl <sub>2</sub> (1 M) Ur distilatua 100 mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Sol. 8 (PEG6000) (100 mL)</b>	60 g polietilen glikol (PEG6000) 1 mL TrisHCl (1 M; pH 7.5) 1 mL CaCl <sub>2</sub> (1 M) Ur destilatua 100 mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>CaCl<sub>2</sub> 1M (200 mL)</b>	22.98 g CaCl <sub>2</sub> Ur distilatua 200 mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>TrisHCl pH 7.5 (200 mL)</b>	24.22 g Trizma base Ur distilatua 200 mL arte pH-a 7.5-ra doitu HCl erabiliz Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>Sakarosa 1.2 M (100 mL)</b>	41.08 g sakarosa Ur distilatua 100 mL arte



	Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>KCl 0.6 M (100 mL)</b>	4.47 g KCl Ur distilatua 100 mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>KCl 0.6 M + 50 mM CaCl<sub>2</sub> (100 mL)</b>	4.47 g KCl 0.74 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O Ur distilatua 100 mL arte Autoklabean esterilizatu (110 °C, 20 min)
<b>KCl + azido zitrikoa (100 mL)</b>	8.2 g KCl 1.2 g azido zitriko monohidratoa pH-a 5.5-era doitu KOH erabiliz Ur distilatua 100 mL arte Filtrazioz esterilizatu 4 °C-tan gorde
<b><i>Protoplasting solution</i> (Erabili baino 30 min lehenago prestatu)</b>	2.048 g Vinotaste Pro (Novozymes) 16 mL KCl + azido zitriko disoluzio 4 °C-tan gorde

**5. Taula.** Protoplastoen lorpenerako eta transformaziorako erabilitako disoluzioak eta hauen osagaiak.

Transformante bakoitza bi aldiz ber-inokulatu zen beharrezko elikagai guztiak zituen AMM medio selektibodun plakatan. Azkenik, DNA erauzketarako laginak lortzeko, plaka banatan hazi ziren.

#### *DNA erauzketa*

Transformazioa behar bezala eman zela ziurtatzeko, diagnosi-PCR-ak burutu ziren. Horretarako, aldez aurretik, transformanteen eta andui parentalen DNA genomikoak erauzi ziren, (Garzia et al., 2009) laneko protokoloan oinarriturik. Lehenik eta behin, anduien esporak kasuan kasuko nutrienteak zituen AMM medio likidoaren 25 mL-tan inokulatu ziren 100 mL-ko erlenmeyerretan. Hauek 18-20 orduz inkubatu ziren 37 °C eta 200 rpm-tan. Miracloth papera erabiliz mizelioak filtratu eta 2 mL-ko hodi banatan bildu ondotik, hurrengo egunera arte liofilizatzen utzi ziren. Liofilizagailutik ateratakoan, lagin homogeneousatzailearen bidez mizelioak txikitu ziren eta, jarraian, hodi bakoitzari 1 mL lisi buffer (Tris 25 mM (pH 8), 0.25 M sakarosa, 20 mM EDTA) eta 100 µL SDS (%10) gehitu zitzaizkion. Laginak 65 °C-tan inkubatu eta gero (15'), fenol/SEVAG (fenol:kloroformo:isoamil alkohola; 25:24:1) disoluzioaren fase organikotik 1 mL gehitu ziren eta inbertsioz nahastu ziren 7-10 minutuz. Bost minutuz abiadura maximoan zentrifugatu ondoren, goiko

faseak pipetaz jaso ziren hodi berrietara. Bigarren erauzketa bat egin zen fenol/SEVAG nahastearekin. DNA-ren prezipitazioarako, bolumenaren hamarren bat NaAc (3 M) eta sei hamarren isopropanol gehitu ziren, laginak 15 minutuz giro tenperaturan utzi aurretik. Beste zentrifugazio bat burutu (15 min, abiadura maximoan) eta likidoa baztertu zen. *Pellet*-a etanolean %80 zen disoluzio baten 1 mL-rekin garbitu zen, eta beste 5 minutuz zentrifugatu eta hutsune bidez ongi lehortu zen. *Pellet*-a 300  $\mu$ L *miliQ* uretan disolbatu eta 2  $\mu$ L RNAsa gehitu eta gero, laginak ordubetez inkubatu ziren 37 °C-tan, RNA ezpurutasunak degradatzeko. Jarraian, bolumenaren beste hamarren bat NaAc (3 M) eta sei hamarren isopropanol gehitu ziren. Kasu honetan, ordea, sortutako faseak ez ziren nahasi, DNA interfasean prezipitatu zedin. Modu honetan, pipetaren puntarekin DNA sarea hartu eta etanolean %80 zen disoluzio baten 500  $\mu$ L zituen hodian jaso zen. Azken zentrifugazio baten ostean (5 min, abiadura maximoan), hutsune bidez likidoa xurgatu, ongi lehortu eta erauzitako DNA laginak 200  $\mu$ L *miliQ* uretan disolbatu ziren. Azkenik, agarosa (%0.8) elektroforesi bat burutu zen DNA erauzketa behar bezala eman zela ziurtatzeko.

#### *Diagonosi-PCR-ak*

Diagonosi-PCR-ak burutzeko erabilitako hastarazleek DNA konstrukzio bakoitzaren ertzetatik 100-200 bp (base pare) 5'-rantz eta 100-200 bp 3'-rantz hibridatzeko balio zuten. Moldetzat transformanteen eta hauen andui parentalen DNA laginak erabili ziren. Helburua, agarosa elektroforesi bidez andui parentalen eta transformanteen DNA laginei zegokien anplikoien tamainen arteko diferentzia ikustea zen. Seigarren taulan, egindako diagonosi-PCR-ak burutzeko erabilitako osagaiak eta bolumenak ikus daitezke, baita PCRaren urrats bakoitzaren tenperatura eta denbora baldintzak ere. Osagai guztiak 250  $\mu$ L-ko hodietan gehitu ziren eta PCR erreakzioak Bio-Rad etxeko T100 termoziklagailuan eman ziren. Azkenik, lortutako produktuak agarosa elektroforesi bidez aztertu ziren.

Osagaiak	Bolumena (µL)
Tanpoia	5
dNTP nahastea	4
sPP1 oligonuk. (FlpA/FlpB)	1.5
GFP2 oligonuk. (FlpA/FlpB)	1.5
DNA genomikoa	1-5 artean
Kappa DNA polimerasa	0.3
miliQ ura	50 arte
<b>GUZTIRA</b>	<b>50</b>

T°	t	} 25 ziklo
95	3'	
95	30"	
59	30"	
72	4'	
72	5'	
12	∞	

**6. taula.** Ezkerrean, diagnosi-PCR erreakzioak burutzeko beharrezko osagaiak eta hauen bolumenak; eskuinean, PCR erreakzioen temperatura eta denbora baldintzak.

Diagnosi-PCR hauen bidez, sortutako andui errekonbinanteak behar bezala transformatuak izan zirela baieztatu zen, alegia, DNA-konstrukzioak genomari behar zen lekuan integratu zirela. Horrela, andui berriak datu basean gorde ziren (1go Taula). Anduien esporak glizerol (%18) disoluzio esteril baten 500 µL-tan bildu ziren, gero -80 °C-tan gordetzeko.

### **Proteinen kokapen zelularren azterketa fluoreszentsia mikroskopia bidez**

Fluoreszentsia mikroskopia bidez, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek hifatan kokapen nuklearra azaltzen duten edo ez behatu zen. Proteina hauek fluoreszentsia berdea emititzen duen GFP proteinarekin (*Green Fluorescent Protein*) etiketatuta zeuden, mikroskopia bidez hauen kokapena aztertzea ahalbidetzen zuena.

Intereseko proteina kimerikoak adierazten zituzten anduiak WMM (*Watch Minimal Medium*; ikus 2. Taula) kultibo medioan hazi ziren. Horretarako, aldeztatik, fosfato iturria gehitu zitzaion medioari (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25mM; 5 M *stock* disoluziotik), karbono (glukosa) eta nitrogeno (amonio tartratoa) iturriak, eta kasuan kasu beharrezko elikagai gehigarriak (ikus 4. Taula). Anduien esporak beharrezko osagaiak zituen WMM-rekin (1.5-2 mL) hornitutako µ-plakatan (35 mm; Ibidi) inkubatu ziren giro-tenperaturan 18 orduz, gutxi gora-behera (Peñalva, 2005).

Proteinen kokapen zelularra behatzeko, Zeiss Axio Observer Z1 fluoreszentsia mikroskopia alderantzizkatua erabili zen (Maria Goyri eraikina,

UPV/EHU, Leioako kanpusa). Hau, 63x Plan Apochromat 1.4 olio murgiltze-lenteekin, eta 38 (kitzikapena 470 nm-tan eta emisioa 525 nm-tan) eta 43 (kitzikapena 545 nm-tan eta emisioa 605 nm-tan) filtroekin hornituta zegoen. Lortutako irudiak ImageJ software-aren bidez aztertu eta editatu ziren (Schindelin et al., 2012).

### **Proteinen erauzketa**

Lehenik eta behin, intereseko anduien konidioak  $10^6$  espora/mL-ko kontzentrazioan inokulatu behar ziren beharrezko elikagaiak zituen MFA medio likidoan, ondoren proteina erauzketa egin ahal izateko. Horretarako, aldezturik, espora asexualen (konidioen) kuantifikazioa burutu zen. Esterilizatutako espatula baten laguntzaz, plaketan hazitako kolonietatik esporak arraspatu eta Tween 20 detergentean %0.02 zen disoluzio baten 10 mL-tan jaso eta homogeneizatu ziren Vortex bidez. Hamar minutuz abiadura maximoan zentrifugatu ondotik, gainjalkina iraulkiz kendu eta konidioen *pellet*-a bigarren aldiz garbitu zen Tween 20-a zuen disoluzioarekin. Azken *pellet*-ari 1 mL Tween gehitu zitzaizkion. Vortex bidez ongi nahasi eta gero, espora suspentsioa lortu zen.

Lortutako espora suspentsioa 1:200 proportzioan diluitu zen (5  $\mu$ L espora disoluzio + 995  $\mu$ L Tween) eta disoluzio honen 15  $\mu$ L Thoma kamera baten gainean gehitu ziren, mikroskopia bidez aztertzeko. Thoma kamera 25 laukiz osatuta dago, eta hauetako bakoitza, aldi berean, 16 lauki txikitan dago banatua. Mikroskopioaren bidez, aipatutako 25 laukietako bakoitzean ikusitako espora kopurua zenbatu eta 25 balioen bataz bestekoa kalkulatu zen. Bataz besteko balioa bider 16 bider  $10^4$  bider diluzioa (kasu honetan, 200) eginda, andui bakoitzeko espora kontzentrazioa kalkulatu zen (espora/mL). Honekin,  $10^6$  espora/mL inokulatzeko espora suspentsiotik (diluzioaren aurrekoa) hartu beharreko bolumena kalkulatu zen. Inokulatu ondotik, 37°C-tan inkubatu ziren 18 orduz.

Gero, ingurune esterilean, esporen hazkundetik sortutako mizelioak filtratu egin ziren inbutu bat eta Miracloth papera erabiliz. Pintzen bidez mizelioak eppendorf hodieta bildu ziren. Parafilmarekin hodiak estali eta orratz baten laguntzaz zuloak egin ziren parafilman, jarraian nitrogeno likidotan sartzeko. Ondoren, liofilizatzen utzi ziren hurrengo egunera arte, hezetasuna kentzeko.

Proteinen erauzketa bi metodo ezberdin jarraituz burutu zen: lehena, A-40 tanpoia erabiliz; eta bigarrena, lisi alkalino bidez. Lehen metodoan, laginak liofilizagailutik aterata, metalezko bolatxo bana sartu eta mizelioak txikitu ziren *Next Advance* etxeko *Bullet Blender* lagin homogeneousatzailearen laguntzaz. Hau hozkailu barruan egin zen laginak gehiegi berotu zitezten ekiditeko. Gero, hodi bakoitzari 1 mL A-40 tanpoia (ikus 7. Taula) gehitu zitzaion. Tanpoi hau mizelioak txikitu aurretik prestatu zen, aurretik prestatutako disoluzioak (ikus 8. Taula) erabiliz. Proteasen aurkako inhibitzaileak (pfa-bloc, pepstatina eta leupeptina) pastilla batean gehitu ziren (Roche etxeko *protease inhibitor cocktail*-a). Horretarako, prestatutako disoluzioaren 1 mL eppendorf batera pasa zen eta pastilla bertan disolbatu zen pipetaren laguntzaz. Disolbatzean, gainerako tanpoiari gehitu zitzaion.

#### A-40 tanpoia

Bukaerako konposizioa	Disoluzioak (15 mL-ko)
25 mM HEPES (pH = 7.5)	750 µL HEPES-K (0.5 M; pH = 7.5)
50 mM KCl	750 µL KCl (1 M)
5 mM MgCl <sub>2</sub>	75 µL MgCl <sub>2</sub> (1 M)
0.001 M EDTA	3 µL EDTA (0.5 M; pH=8)
%10 Glizerol	1.5 mL %100 Glizerol
0.5 mM DTT	7.5 µL DTT (1 M)
miliQ ura	15 mL arte

**7. Taula.** A-40 bufferraren konposizioa eta honen 15 mL prestatzeko beharrezko disoluzioak.

Disoluzioa	Prestaketa
<b>HEPES 0.5 M; pH = 7.5</b>	11.92 g HEPES Ur distilatua gehitu 80 mL arte pH-a 7.5-era doitu NaOH-tan 4M den disoluzioarekin 100 mL arte ur distilatua gehitu
<b>EDTA 0.5 M; pH = 8</b>	18.61 g EDTA Ur distilatua gehitu 80 mL arte pH-a 8-ra doitu NaOH-tan 4M den disoluzioarekin 100 mL arte ur distilatua gehitu

<b>KCl 1 M</b>	7.46 g KCl pisatu 100 mL arte ur distilatua gehitu
<b>DTT 1 M</b>	15.43 g DTT 100 mL arte ur distilatua gehitu Alikuotatan banatu eta -20 °C-tan gorde

**8. Taula.** A-40 bufferraren osagai diren disoluzioen prestaketa.

Mizelioa bufferrarekin ongi nahasitakoan, norian irabiatuz inkubatu ziren 4 °C-tan ordu eta erdiz. Hogeita hamar minutuz 4 °C eta 14000 rpm-tan zentrifugatu ondoren, gainjalkina beste hodi batean bildu zen dekantazioz. Lagin bakoitzaren 0.5 µL hartu eta 1 mL Bradford erreaktibo gehitu zitzaion eta, lagin txuriarekin batera (1 mL Bradford soilik), espektrofotometroan absorbantziak neurtu ziren 595 nm-ko uhin luzeran. Lambert Beer-en legeaz baliatuz (1go ekuazioa), proteina kontzentrazioa kalkulatu zen.

$$OD_{595\text{ nm}} = A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad [1]$$

$$\text{non } \varepsilon = 0.07 \mu\text{L} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ eta } l = 1 \text{ cm diren}$$

Lagin bakoitzaren proteina kontzentrazioa ezagututa, 200 µg proteina edukitzeko beharrezko alikuotak bildu ziren, eta erauzkin gordinak -80 °C-tan gorde ziren.

Proteinen erauzkin gordinetatik, 200 µg-ri zegokien bolumenak miliQ ur hotzarekin osatu ziren 200 µL arte, eta 10 µL TCA (azido trikloroazetiko; %100) gehitu zitzaizkien. Ongi nahasi ondoren, 5-10 minutuz izotzetan inkubatu ziren laginak eta 5 minutuz zentrifugatzen jarri ziren 4 °C eta 14000 rpm-tan. Hutsean, punta luze baten laguntzaz, gainjalkinak baztertu ziren eta *pellet*-ak ahalik eta lehorren utzi ziren. Ondoren, 800 µL etanol:eter 1:1 nahastearekin garbitu, berreseki eta zentrifugatu zen baldintza beretan. Prozesua errepikatu zen, kasu honetan, 800 µL etanol:eter 1:3 nahastearekin garbituz eta berreseki. Zentrifugatu ondotik, gainjalkina baztertu eta, hodiaren estalkia irekita, lehortzen utzi ziren 10-15 minutuz. Azkenik, hodi bakoitzari 80 µL haustura-tanpoi (TR, ikus 9. Taula) gehitu eta *Vortex* bidez nahasi ziren. Proteina laginak -20 °C-tan gorde ziren.

### Haustura-tanpoia (TR)

Bukaerako konposizioa	9 mL-tan
625 mM Tris-HCl; pH = 6.8	1.5 mL Tris 0.5 M; pH = 6.8
%2 SDS	1.8 mL SDS %10
%5 $\beta$ -merkaptotanol	0.45 mL
6 M urea	3.24 g
miliQ ura	9 mL arte
Bromofenol urdina	Oso gutxi

**9. Taula.** Haustura-tanpoiaren konposizioa eta honen 9 mL prestatzeko beharrezko osagaiak.

Liofilizatutako mizeliotik abiatuta, proteina erauzteko beste aukera bat lisi alkalinoa burutzea da (Hervás-Aguilar eta Peñalva, 2010). Horretarako, aurreko prozeduran bezala mizelioa txikitu zen, metalezko bolatxoak kendu eta liofilizatutako mizelioaren 6mg gutxi gora-behera beste hodi batera pasa ziren. Orduan, lisi bufferraren (ikus 10. Taula) mililitro bana gehitu zitzaion lagin bakoitzari, beti izotzetan, eta pipetarekin lagunduz berreseki zen. Buffer hau mizelioa txikitu aurretik prestatu zen 10. Taulan azaltzen den moduan.

### Lisi bufferra

Bukaerako konposizioa	10 mL-tan
0.2 M NaOH	200 $\mu$ L NaOH 10 M
%0.2 $\beta$ -merkaptotanol	20 $\mu$ L $\beta$ -merkaptotanol
miliQ ura	9780 $\mu$ L miliQ ura

**10. Taula.** Lisi bufferraren konposizioa eta honen 10 mL prestatzeko beharrezko osagaiak.

Proteinak 75  $\mu$ L TCA gehituz prezipitatu ziren. Hatzekin ongi nahasi eta izotzetan 10 minutuz inkubatu ondoren, 5 minutuz zentrifugatu jarri ziren 4 °C eta 14000 rpm-tan. Gainjalkina xurgatuz *pellet*-a lehortu zen eta bigarren zentrifugazio bat egin zitzaion, TCA guztia eliminatzeko. *Pellet*-a guztiz lehor egotean, 100  $\mu$ L Tris Base (1 M) gehitu zitzaion, hatzekin ongi nahasiz. Azkenik, haustura-tanpoiaren 200  $\mu$ L gehitu ziren, Vortex bidez nahasi eta minutu batez zentrifugatu, -20 °C-tan gorde aurretik.

## **Proteinen Western-Blot bidezko immunodetekzioa**

Western-Blot-a proteinen immunodetekziorako erabiltzen den prozedura garrantzitsu bat da. Bertan, proteinak, sodio dodezil sulfato poliakrilamida gel elektroforesi (SDS PAGE) bidez bereizten dira, eta lortutako proteina-patroia geletik mintz mikroporotsu batera transferitzen da korrante elektriko baten eraginpean (Kurien eta Scofield, 2015). Ondotik, intereseko proteina identifikatu eta detektatu egiten da antigorputzen bidez. Atal honetan, Western-Blot-a burutzeko jarraitu beharreko pausuak azalduko dira.

### *Laginen preskaketa*

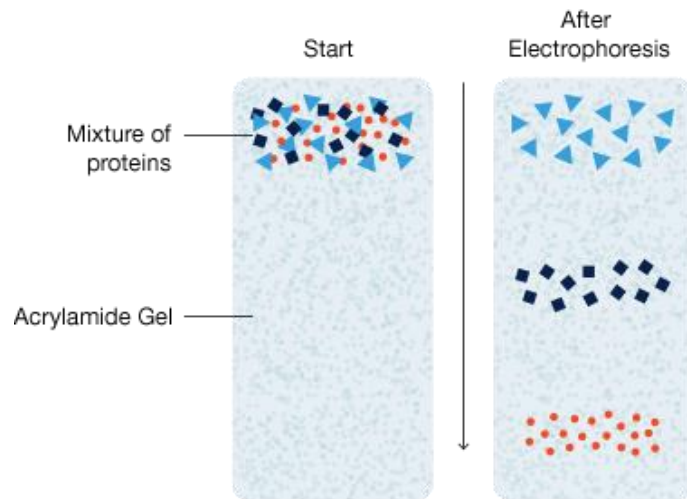
Aurretik -20 °C-tan gordetako laginak (A-40 tanpoiarekin edo lisi alkalino bidez erauziak) eta pisu molekularreko markatzailea berotu ziren gelean kargatu aurretik. Western-Bloterako pisu markatzailearen (gel elektroforesian proteina baten gutxi gora-beherako tamaina determinatzeko erabiltzen den estandarra, tamaina eta kontzentrazio ezaguna duena) kasuan, 5-10 µL hartu ziren eta 10 µL haustura-tanpoi (TR) gehitu zitzaion. Jarraian, aztertu beharreko laginekin batera, 95 °C-tan berotu zen 5 minutuz.

### *Elektroforesia*

Proteinen banaketa elektroforesi bidez burutu zen, non tamaina eta puntu isoleketriko desberdineko proteinek gel polimeriko batean zehar migrazio abiadura desberdinez korrika egiten duten eremu elektriko bat aplikatuta (BioRad; *Introduction to Western Blotting*). Prozesu hau tanpoi eroale baten presentzian egiten da, proteinen azido eta base taldeen ionizazio-maila eta proteinen konformazioa kontrolatzea ahalbidetzen duena.

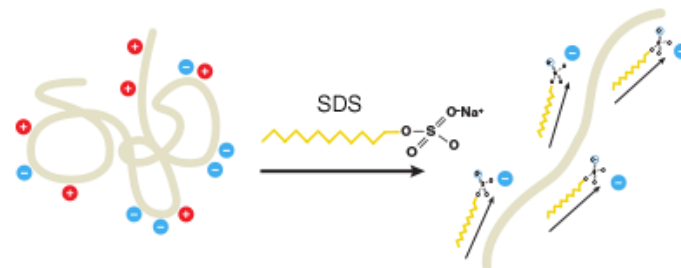
Poliakrilamida gel elektroforesian (PAGE), gelaren egitura porotsuak proteina txikiei azkarrago korrika egitea ahalbidetzen die proteina handiekin alderatuz, horrela, tamaina desberdineko proteinen banaketa ahalbidetuz (ikus 5. irudia).





**5. irudia.** Poliakrilamida gel elektroforesi (PAGE) bidezko proteinen banaketaren irudi eskematikoa. Bio-Rad etxearen webgunetik eskuratutako irudia.

Lan honetan, SDS-PAGE mini gelak (Mini-Protean TGX Gels; Bio-Rad) erabili ziren, dagoeneko prestatuta zetozenak. Sodio dodezil sulfatoa (SDS) erabili zen detergente moduan. Honek, alde batetik, proteinen desnaturalizazioa errazten du, haga itxurako konformazioa lortuz eta, bestetik, proteinei karga total negatiboa gehitzen die (ikus 6. irudia). Bi efektu hauek proteinen banaketa hobean laguntzen dute.



**6. irudia.** SDS (sodio dodezil sulfato) detergentearen efektuek proteinen banaketa hobetzen dute. Alde batetik, proteinen desnaturalizazioa errazten du, haga itxurako konformazioa eraginez, eta bestetik, karga total negatiboa gehitzen die proteinei. Bio-Rad etxearen webgunetik eskuratutako irudia.

Muntaiari dagokionez, gel-ak bi ganberen artean finkatu eta kubetan sartu ziren, kristalak barrurantz orientaturik. Elektroforesi kubeta SDS-PAGE (1x) tanpoi disoluzioarekin (10x disoluziotik abiatuta) bete zen markatutako marraraino, beti gel-en arteko ganbera goraino beteta egotea ziurtatuz.

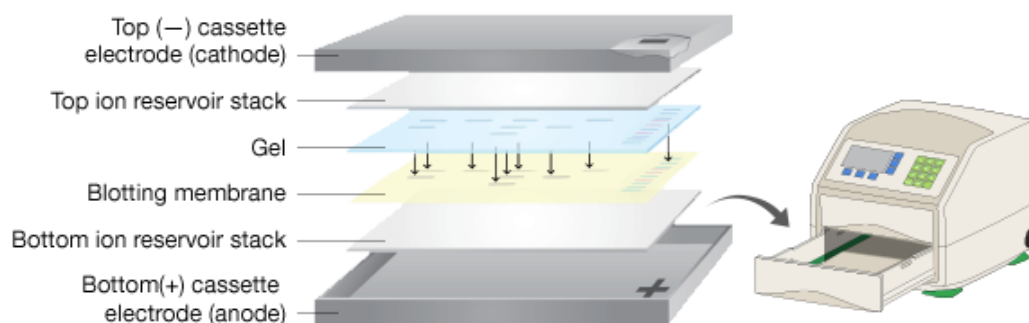
Lagin bakoitzeko 10-15  $\mu\text{L}$  kargatu ziren kale bakoitzean, eta pisu molekularreko markatzailearen 5-10  $\mu\text{L}$ . Laginek korrika egin zezaten, hasieran,

400 V eta 15 mA/gel-eko korronea aplikatu zen, eta behin proteinak gel-ean zentimetro inguru sartuta, 30 mA/gel-eko korronea igo zen. Korrika egiten utzi zen harik eta frontea gel-aren azpialdetik atera arte.

### *Proteinen transferentzia mintzera*

Elektroforesia bukatuta, gel-eko proteinak nitrozelulosa mintz batera transferitu ziren transferentzia erdi-lehor bidez. Sistema mota honetan, gel-a horizontalki kokatuta dago tanpoiz saturaturiko filtro paperen artean, elektrodoekin kontaktuan (ikus 7. irudia). Ere elektrikoa gel-eko proteinak eluzio bidez mintzera transferitzea eragiten du. Izan ere, bi elektrodoen artean potentzial-diferentzia aplikatzean, proteinek mintzera migratzen dute sortutako korronea jarraituz.

Lan honetan, Transblot Transfer Pack bat erabili zen (Trans-Blot Turbo Transfer Pack; Mini format; 0.2  $\mu$ m PVDF; Bio-Rad). Beheko zatia edo papera kajoian ipini zen, gainean gel-a (gorantz begira), eta azkenik goiko zatia, *sandwich* moduko egitura osatuz (ikus 7. irudia). Taparekin itxi eta kajoia *Transblot Transfer System* gailuan (Bio-Rad) sartu zen, transferentzia burutzeko (7 min, 13 A, 25 V).



**7. irudia.** Transferentzia azkarreko sistemek euren filtro paperak eta tanpoi espezializatuak dituzte. Paperak eta mintza aurretik heze dakartzaten *pack*-ak erabiltzen dira eta gel-a goiko eta azpiko zatiaren artean kokatzen da, *sandwich* moduko egitura osatuz. Gel-a eta mintza elkarrekin kokatzen dira, elektrodoen artean iragazpapera dagoelarik. Bi elektrodoen artean potentzial-diferentzia bat aplikatzean, proteinak gel-etik mintzera pasatzen dira katodetik anodorako norantzadun korronearen bitartez (SDS-a dela eta proteinak negatiboki kargatuak daudelako).

### *Immunodetekzioa*

Transferitutako proteinak mintzaren gainazalari lotzen zaizkio, immunodetekziorako erreakzioak ahalbidetuz. Immunodetekzioak antigeno edo proteina espezifikoaren identifikazioa ahalbidetzen du hauek ezagutzen dituzten

antigorputzen bidez (Gallagher et al., 2011). Lehenik eta behin, lotura ez-espezifikoa eman dezaketen toki posibleak blokeatu behar dira. Horretarako, mintza “*blocking*” disoluzioan (ikus 11. Taula) inkubatu zen 100 minutuz agitazioarekin, eta jarraian PBS-T disoluzioa-rekin (ikus 11. Taula) garbitu zen 10 minutuko bainu bat eta 5 minutuko bi bainu eginez.

Disoluzioa	Prestaketa
<b>PBS (10x)</b>	80 g NaCl 2 g KCl 14.4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 800 mL ur distilatu pH doitu 7.4-ra eta enrasatu 1 L arte Autoklabatu
<b>PBS (1x)</b>	PBS-10x disoluzioaren 100 mL Ur distilatuarekin diluitu 1 L arte
<b>PBS-T</b>	PBS-10x disoluzioaren 100 mL Ur distilatua 1 L arte 500 µL Tween 20, %0,02
<b>“Blocking” disoluzioa</b>	15 mL PBS-1x 0.75 g esne hautsa (%5) (Central Lechera Asturiana)

**11. Taula.** Immunodetekzioan erabilitako disoluzioak eta hauen prestaketa.

Ondotik, mintza lehenengo antigorputzarekin (ikus 12. Taula) inkubatu zen ordu betez agitazioarekin. Antigorputz primarioak gure intereseko proteinari lotutako etiketa ezagutzen eta lotzen du era espezifiko eta selektiboan, antigeno-antigorputz konplexua eratuz (Gallagher et al., 2011). Mintza, jarraian, PBS-T-rekin garbitu zen (10 minutuko 3 garbiketa) lotu gabe geratutako antigorputzak baztertzeko. Ondoren, peroxidasa aktibitate entzimatikodun antigorputz sekundarioarekin (ikus 12. Taula) inkubatu zen mintza, eta lehenik PBS-T-rekin (10 minutuko 3 garbiketa) eta gero PBS-1x-rekin (10 min) garbitu zen.

	Antigorputza	Diluzioa	Iturria	Erreferentzia
<i>Primarioak</i>	α-GFP	1:1000	Sagua	7,1 eta 13,1 klonak, Roche
	α-aktina	1:5000	Sagua	C4 klona, ICN Biomedicals Inc.
	α-HA	1:1000	Sagua	F-7, sc-7392, Santa Cruz Biotechnology

<i>Sekundarioak</i>	$\alpha$ -mouse IgG	1:2500	Ahuntza	115-035-003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC
---------------------	---------------------	--------	---------	---

**12. Taula.** Erabilitako antigorputz primario eta sekundarioak, eta bakoitzaren iturria eta egin beharreko diluzioa.

Antigorputz sekundarioak antígeno-antigorputz primario konplexua lotzen du, eta hari lotuta duen peroxidasa aktibitate entzimako konjugatuak (HRP, errefau peroxidasa) substratu kimiko baten (luminol) oxidazioa katalizatzen du, argia sortuz produktutzat. Honi kimiolumineszentzia bidezko detekzioa deritzo. Peroxidasa aktibitatea ECL (Enhanced Chemiluminescent, Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) substratuaren bidez induzitu zen, luminola duena. ECL produktua bi disoluziotan dator banatua, erreakzioa burutu arte nahastu behar ez direnak. Erreakzio entzimatikoa eragiteko, ECL ontzi bakoitzetik 1 mL hartu eta polipropilenoazko hodi batean nahasi ziren, eta nahastea mintzaren gainazalean gehitu zen, azalera osora zabalduz. Minutu baten ondotik, mintza film artean bildu eta errebelatu zen. Kimiolumineszentzia Chemidoc + XRS sistemaren bidez detektatu zen (Bio-Rad).

### *Kontrolak*

Western Blot-aren emaitzen fidagarritasuna hobetzarren, hainbat faktore kontrolatu behar dira: haien artean, kargatutako proteina kopurua eta transferentziaren efizientzia (Welinder eta Ekblad, 2011). Horregatik, errore iturri posibleak aztertzeke, kontrol desberdinak erabili daitezke. Batetik, aktina erabili zen karga kontrol bezala. Aktina, izan ere, zeluletan etengabe sintetizatzen den proteina bat da eta, honen aurkako antigorputzak erabiliz, banda bat azaltzen du 42 kDa-eko tamainan. Hala ere, kasu batzuetan ez zen lortu aktinaren banda ikustea. Bestetik, kontrol eran ere, Coomassie-rekin tindatutako gel bat erabili zen (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain, Bio-Rad). Hau, Western-Bloterako gel-arekin batera kargatu eta korrika egiten jarri zen. Kasu honetan, Coomassie-rako pisu molekularreko markatzailetik (*Unstained*) 0.5  $\mu$ L kargatu ziren. Elektroforesia burututa, Coomassie-rako gel-ari 5 minutuko 3 ur-garbiketa egin zitzaizkion, 40 mL Coomassie gehitu aurretik. Ordu betez irabiatzen eduki ondoren, ur-garbiketak egin eta argazkia atera zitzaion Chemidoc + XRS sistema erabiliz (Bio-Rad).

## Fosfatasa alkalinoaren froga

Intereseko proteinak fosforilaturik egon litezkeen aztertzeko, hurrengo hiru anduien proteina erauzkinak erabili ziren: 1) Stk47::HA<sub>3x</sub>, 2)  $\Delta flpA$ ; Stk47::HA<sub>3x</sub> (*flpA* genea ezabatua duen mutantea) eta 3)  $\Delta flpB$ ; Stk47::HA<sub>3x</sub> (*flpB* genea ezabatua duen mutantea). Proteinak erauzi eta kontzentrazioa kalkulatu ondotik, 100  $\mu$ g proteina edukitzeko beharrezko bolumena kalkulatu eta andui bakoitzeko hiru alikuota bildu ziren (ikus 13. Taula), guztira 9 lagin edukitzeko. Lehenengo alikuotari 10  $\mu$ L  $\lambda$ PP tanpoi ( $\lambda$  fosfatasa entzimak proteinetatik fosfato taldeak ezabatuko lituzke) eta 10  $\mu$ L MnCl<sub>2</sub> gehitu zitzaizkion, eta urarekin osatu 100  $\mu$ L arte. Bigarren alikuotari, aurreko osagaiez gain,  $\lambda$  fosfatasa entzimaren 1  $\mu$ L ere gehitu zitzaion. Eta azkenaren kasuan, aurreko osagaiez gain, 10  $\mu$ L sodio vanadato ere gehitu ziren. Vanadato ioiek  $\lambda$  fosfatasaren aktibitatea inhibitzen dute, eta ondorioz, entzima honek burutuko lukeen proteinen fosfato taldeen ezabaketa inhibituko lukete.

Lagina	Osagaiak
1	100 $\mu$ g proteina erauzkin gordinetik + 10 $\mu$ L $\lambda$ PP tanpoi + 10 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> + ur distilatua 100 $\mu$ L arte
2	100 $\mu$ g proteina + 10 $\mu$ L $\lambda$ PP tanpoi + 10 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> + <b>1 <math>\mu</math>L <math>\lambda</math>PP</b> + ur distilatua 100 $\mu$ L arte
3	100 $\mu$ g proteina + 10 $\mu$ L $\lambda$ PP tanpoi + 10 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> + 1 $\mu$ L $\lambda$ PP + <b>10 <math>\mu</math>L sodio vanadato</b> + ur distilatua 100 $\mu$ L arte

**13. Taula.** Fosforilazio frogarako laginen osagaiak. Andui bakoitzeko, taulan azaltzen diren hiru laginak prestatu ziren, guztira 9 lagin.

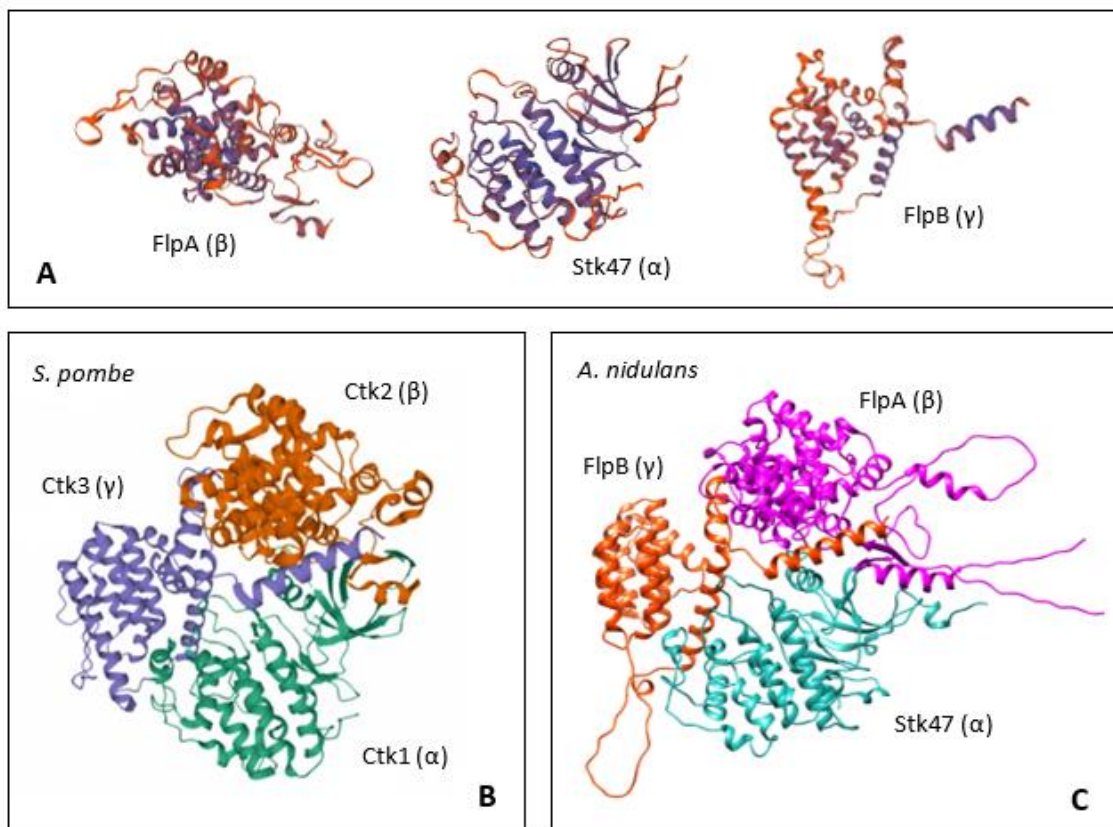
Laginak 20 minutuz 30 °C-tan inkubatu eta gero, 15  $\mu$ L TCA gehitu zitzaion bakoitzari (izotzetan), entzima desaktibatzen. Ondoren, proteinak prezipitatu ziren alde aurretik azalduko prozedura jarraituz. Haustura-tanpoiaren (TR) 40  $\mu$ L gehitu eta *pellet*-a ongi disolbatu ondotik, laginak -20 °C-tan gorde daitezke edo 95 °C-tan eduki 5 minutuz zuzenean SDS-PAGE gelean kargatzeko. Western-Blot proba aurreko prozedura jarraituz burutu zen.

## EMAITZAK

### **1. FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek *S. pombe*-ren Ctk1, Ctk2 eta Ctk3 proteinek osatzen duten CTDK-1 motako konplexuaren parekoa osatuko lukete CollabFold adimen artifizialaren arabera.**

(Agirrezabala, 2021) master amaierako lanean burututako FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen eremu funtzionalen azterketan, FlpA ziklina bat izan zitekeela ikusi zen (eremu funtzionala 5-391 aminoazidoen artean). Stk47-ri dagokionez, kinasa bat izan zitekeela ondorioztatu zen (eremu funtzionala 754-1039 aminoazidoen artean). Hau horrela, FlpA ustezko ziklinak Stk47 ustezko kinasa-menpeko ziklinarekin (CDK) CTDK-1 motako konplexua osatzen zuela proposatu zen, eta FlpB proteinak (eremu funtzionala 2-239 aminoazidoen artean) aurreko bien arteko zubi lana egiten zuela (Xie et al., 2021). CTDK-1 konplexuek funtzio garrantzitsua betetzen dute transkripzio prozesuan, RNA polimerasa II konplexuaren aktibitatea erregulatzen baitute honen azpiunitate nagusiaren (Rpb1-en) C-terminal eremuaren (CTD) Ser2-ren fosforilazio bidez (Xie et al., 2021). Proteina baten egitura hirudimentsionalak bere funtzioarekin lotura zuzena duenez, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen egituren aurreikuspena burutzea erabaki zen.

Horretarako, lehenik, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen egitura hirudimentsionala aurreikusi zen Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>; (Waterhouse et al., 2018)) plataforma erabiliz. Proteina bakoitzarentzat aurreikusitako egitura posiblea 8A irudian erakusten da.



**8. irudia.** FlpA, Stk47 eta FlpB proteinentzat aurreikusitako egitura hirudimentsionalak biltzen dituen irudia. **A.** Swiss-Model plataformaren bidez *Aspergillus nidulans* espeziearen FlpA, Stk47 eta FlpB proteinentzat aurreikusitako egitura hirudimentsionalak. **B.** Xie *et al.* (2021) lanean deskribatutako *S. pombe*-ren CTDK-1 konplexuaren egitura hirudimentsionala, Ctk1, Ctk2 eta Ctk3 azpiunitateez osatua. **C.** FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek elkarren artean osatuko luketen konplexuaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena, AlphaFold programaren CollabFold aldaera bidez kalkulatu. Stk47 ustezko kinasa  $\alpha$  azpiunitatea izango litzateke, FlpA ustezko ziklina  $\beta$  azpiunitatea, eta FlpB aurreko bien arteko zubi lana beteko lukeen  $\gamma$  azpiunitatea.

*A. nidulans* espeziearen Stk47, FlpA eta FlpB proteinak, *S. pombe* ondoan ezaugarritutako Ctk1, Ctk2 eta Ctk3 proteinen ortologoak dira, hurrenez hurren, elkarren artean CTDK-1 motako konplexu bat osatzen dutenak (Xie et al., 2021). Aztergai den proteina bakoitzaren egitura bere ortologoarenaren antzekoa zela ikusi zen, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek ere elkarren artean antzeko konplexu bat osa lezaketela iradokiz (8B irudia). Hau horrela, intereseko hiru proteinen arteko ustezko konplexuaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena burutu zen AlphaFold (AlphaFold2.ipynb) plataformaren CollabFold aldaeraren bidez. Programa honek, adimen artifizialaren bitartez, proteinen egitura hirudimentsionalak aurreikusten ditu beraien aminoazido sekuentzietan (edo zatietan) oinarrituz. Lortutako egitura 8C irudian erakusten da. Eskuratutako

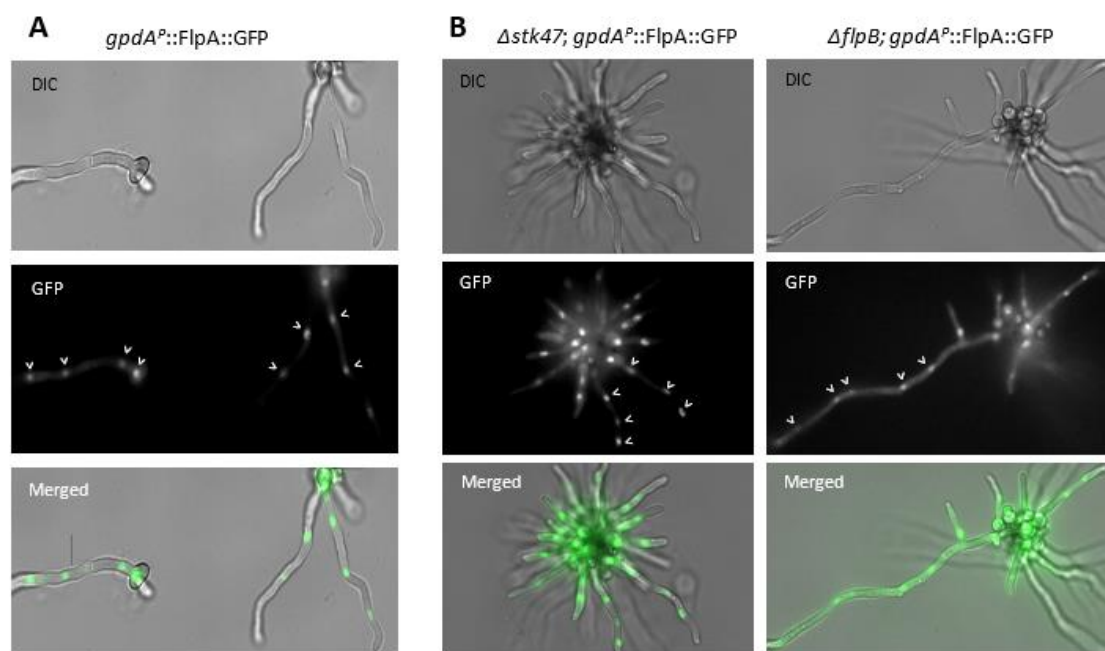
emaitzei erreparatuz, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek *A. nidulans*-en osatuko luketen konplexuak (8C irudia) *S. pombe*-n Ctk1, Ctk2 eta Ctk3 proteinek osatzen duten konplexuarekin (8B irudia) antzekotasun nabarmenak erakusten ditu. Honek, FlpA, Stk47 eta FlpB-k CTDK-1 motako konplexua osatuko luketela iradokitzen du.

## **2. Stk47 ziklina menpeko kinasaren kokapen zelularra FlpA ziklinaren menpekoa da, honen gabezia kokapen nuklearra galtzen duelarik.**

Aurreko atalean azaldu den moduan, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek elkarrekin konplexu bat osatzen dutela uste da, zeinak RNA polimerasa II konplexuaren aktibitatearen kontrolean funtzio garrantzitsua bete dezakeen. Transkripzio prozesua nukleoan ematen denez, hiru proteina horiek kokapen nuklearra izan zezaketela pentsatu zen, eta (Agirrezabala, 2021) MAL-ean, hipotesi hori baieztatu zen. Lan honetan, hiru proteinetako bakoitzaren banakako kokapenez gain, hauek elkarren arteko menpekotasunik ba ote zuten ere behatu nahi zen. Horretarako, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen lokalizazioa aztertu zen fondo genetiko basatian eta, kasuan kasu, beste bi fondo genetiko nuluetan. Ziortza Agirrezabalaren lanean ikusi zen moduan, hiru proteinek, banaka, kokapen nuklearra erakutsi zuten (9A, 10A eta 11A irudiak).

Ondoren, FlpA proteinaren lokalizazioa behatu zen  $\Delta stk47$  eta  $\Delta flpB$  fondo genetikoetan, alegia, bi gene/proteina horien gabezia. Aztertutako anduietan FlpA uestezko ziklinak ez zuen kokapen nuklearra galdu nuluetako batean ere, bi kasuetan nukleoak ikusten jarraitzen zirelarik (9B irudia). Emaitza hauen arabera, FlpA proteinaren kokapen nuklearrak ez du Stk47 eta FlpB-ren aktibitateen beharrik.



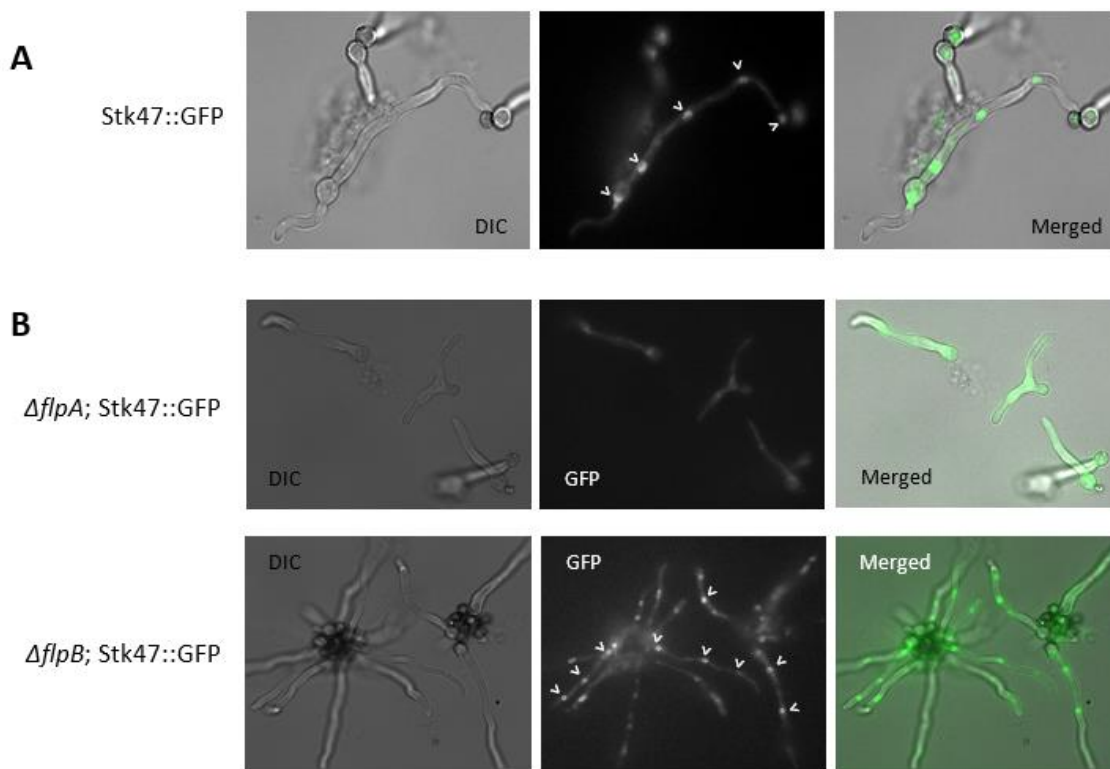


**9. irudia.** FlpA proteinaren kokapen zelularren mikroskopia bidezko azterketan lortutako irudiak. (Agirrezabala, 2021) MAL-ean deskribatu zen FlpA::GFP kimera *flpA* promotorepean adieraztean ez zela fluoreszentsiarik detektatzen. Horregatik, FlpA::GFP kimeraren kontzentrazioa hifatan handitzeko, *gpdA* promotorea erabili zen. **A.** Fondo genetiko basatian, FlpA proteinak kokapen nuklearra erakutsi zuen. **B.**  $\Delta stk41$  eta  $\Delta flpB$  fondo genetiko nuluetan, FlpA proteinak kokapen nuklearra mantentzen zuela ikusi zen. Honen arabera, FlpA-k ez luke Stk47 eta FlpB-ren aktibitatearik beharko nukleoetan pilatzeko.

Stk47 ustezko kinasaren kasuan, proteina honek fondo genetiko basatian erakusten zuen kokapen nuklearra galdu egin zen  $\Delta flpA$  fondo genetiko nuluan (10B irudia). Honek iradokitzen du, FlpA proteinak nolabaiteko eragina izan lezakeela Stk47 proteina nukleora iristeko eta bertan pilatzeko prozesuan. Izatez, Stk47 ziklina-menpeko kinas bat dela onartuz gero, eta FlpA ustezko ziklinarekin CTDK-1 motako konplexua osatzen duela, zentzua luke lehenaren kokapen zelularra bigarrenaren menpekoa izateak. Aurretik azaldu den moduan, ziklinek ziklina-menpeko kinasen jarduera aktibatu eta desaktibatzen dute fosforilazio bidez. Ondorioz, FlpA ustezko ziklinak Stk47-ren aktibitatea erregulatzen duela onartzen badugu, pentsatu dezakegu Stk47-ren garraioa eta metaketa nukleoan ere FlpA-ren menpekoa izanen dela.

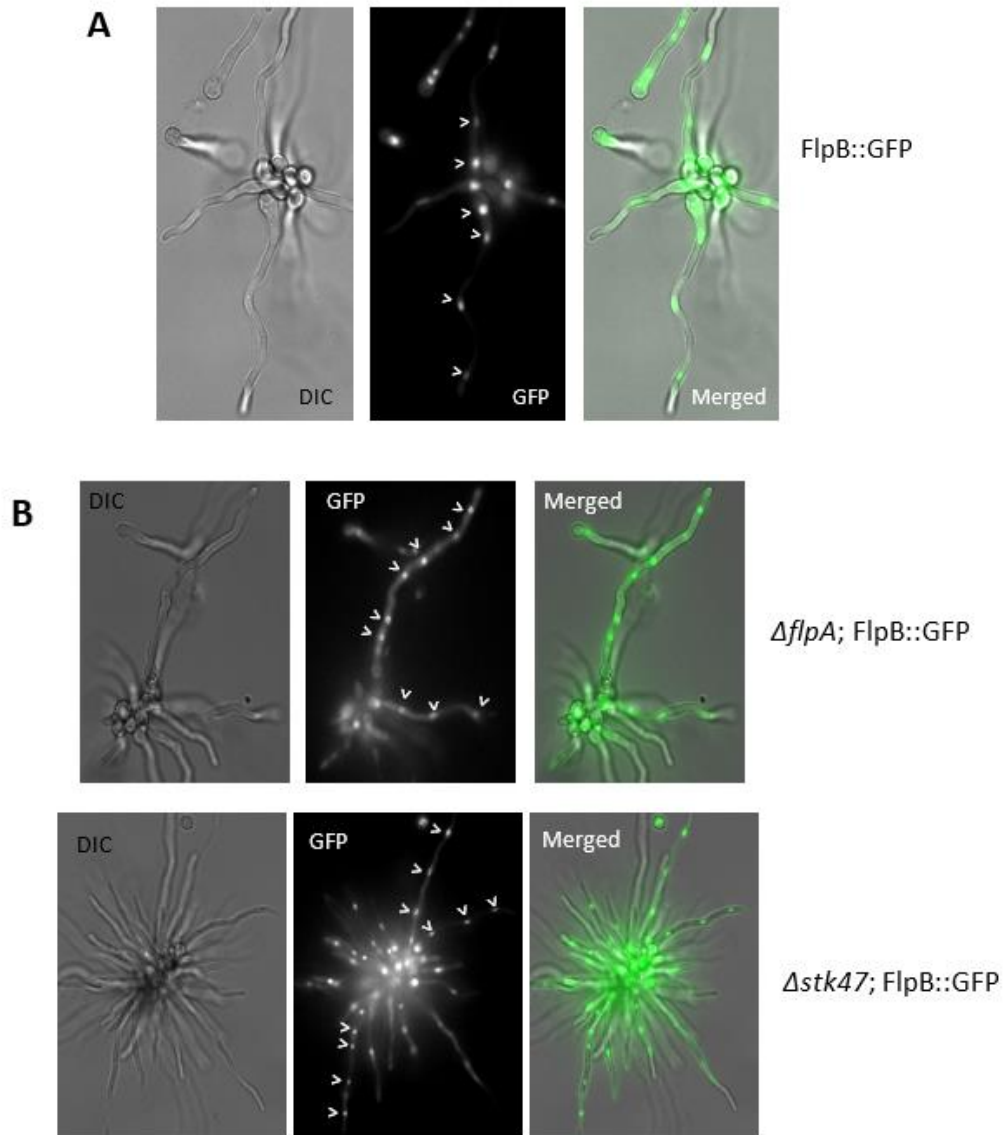
$\Delta flpB$  fondo genetikoan, aldiz, Stk47-ren lokalizazio nuklearra mantendu egin zela ikusi zen (10B irudia). Honi erreparatuz, pentsatu daiteke Stk47-ren kokapen zelularrak ez duela zertan FlpB proteinarekin menpekoa izan. Aipatu bezala, FlpB-k, FlpA eta Stk47-ren arteko zubi lana egiten duen azpiunitatea osatzen duela

proposatu zen (Xie et al., 2021). Hau horrela izanik, Stk47-ren aktibitatean nolabaiteko eragina izan lezakeela pentsa zitekeen, FlpA-rekiko loturan parte hartzen duelarik. Mikroskopia emaitzek, ordea, ez dute hipotesi honekin bat egiten.



**10. irudia.** Stk47 proteinaren kokapen zelularren mikroskopia bidezko azterketan lortutako irudiak. **A.** Stk47 proteinak lokalizazio nuklearra erakutsi zuen fondo genetiko basatian. **B.**  $\Delta flpB$  nulu sinplean kokapen nuklearra mantentzen zuela ikusi zen, FlpB-rekiko menpekotasunik erakutsi gabe.  $\Delta flpA$  fondo genetikoan, ordea, Stk47-k bere kokapen nuklearra galtzen zuela ikusi zen. Honek, Stk47 ustezko kinasak bere kokapen nuklearrerako FlpA ustezko ziklinaren aktibitatea behar duela iradokitzen du.

Azkenik, fondo genetiko basatian FlpB-ren kokapen nuklearra (11A irudia) baieztatu ondotik, FlpA eta Stk47-rekiko menpekotasun posibleak bilatu ziren,  $\Delta flpA$  eta  $\Delta stk47$  fondo genetiko nuluetan kokapena mantentzen zuen ala ez aztertuz. Lortutako irudien arabera, ordea, FlpB-k kokapen nuklearra mantentzen duela dirudi (11B irudia). Hau horrela, proteina honek bere kokapen nuklearrerako FlpA edo Stk47 aktibitateen beharrik ez duela dirudi.



**11. irudia.** FlpB proteinarekin kokapen zelularraren mikroskopia bidezko azterketan lortutako irudiak. **A.** Fondo genetiko basatian, FlpB proteinak kokapen nuklearra erakutsi zuen, espero zen moduan. **B.**  $\Delta stk47$  edo  $\Delta flpA$  nulu sinpleetan, FlpB-k lokalizazio nuklearra mantentzen zuela ikusi zen eta, beraz, azken honen kokapen nuklearrak beste bi proteinekiko dependentziarik ez duela ondorioztatu zen.

Mikroskopiako irudien bidez, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen lokalizazio zelularra eta hauen arteko menpekotasun posibleak aztertu ziren. Hiru proteinen arteko ustezko elkarrekintzak sakonago aztertzearen, hauen espresioa behatu zen immunodetekzio bidez, fondo genetiko basatietan zein nuluetan, elkarren artean nolabaiteko dependentziarik egon zitekeen identifikatzeko helburuarekin.

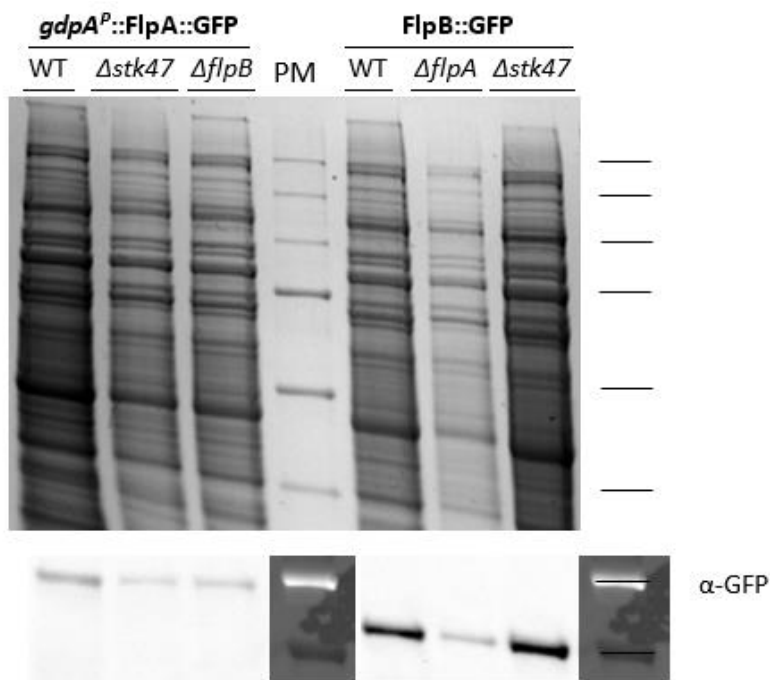
### 3. Stk47 proteinaren immunodetekzio banden patroia aldatu egiten da FlpA zein FlpB-ren gabeziarekin.

FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen kontzentrazio eta integritatea aztertzeko, eta hiruetako baten gabeziak besteengan zein eragin izan lezakeen aztertzeko, Western-Blot immunodetekzio probak burutu ziren. Elektroforesi bidez proteinak bereizi eta hauen geletik mintzerako transferentzia egin ondotik, kasuan kasuko markatzailearen kontrako antigorputzak erabiliz, intereseko proteinari dagokion banda edo bandak ikustea du helburu proba mota honek. Hiru proteinak fondo genetiko basatian eta gainerako bi fondo nuluetan aztertu ziren, hauen espresioa elkarren menpekoa izan zitekeen aztertu nahirik.

Lehenik, *gpdA<sup>P</sup>::FlpA::GFP*-ren espresioa aztertu zen, fondo genetiko basatian eta  $\Delta$ *stk47* eta  $\Delta$ *flpB* fondo genetiko nuluetan (E1 irudia), proteinak erauzteko eta immunodetekzioa egiteko zein klon izan zitekeen egokiena ikusteko helburuarekin. Horrela, aztertutako kimerak adierazten zituzten transformanteak identifikatu ziren. Fondo basatian, BD1442 anduia aukeratu zen, banda bat erakusten baitzuen 66 kDa inguruan (FlpA ~39 kDa + GFP ~27 kDa).  $\Delta$ *stk47* fondo genetiko nuluan (Stk47 proteinaren gabezia, alegia), bi anduietako batean (BD1494) ere banda bat ikusten zen tamaina berean, eta  $\Delta$ *flpB* fondo genetikoan (FlpB proteinaren gabezia) aztertu ziren bi anduietan, ordea, ez zen bandarik ikusi. Hortaz, hurrengo Western-Blot batean fondo genetiko bereko beste bi andui (BD1485 eta BD1486) aztertu ziren, eta biek azaldu zuten banda bat 66 kDa inguruan (ez erakutsia). 12. irudian, FlpA-ren espresioaren azterketa errepikatua azaltzen da, aurretik baieztatutako BD1442 (fondo genetiko basatia), BD1494 ( $\Delta$ *stk47* fondo genetiko nulua) eta BD1485 ( $\Delta$ *flpB* fondo genetiko nulua) anduietan.

FlpA-rekin batera, FlpB-ren espresioa ere behatu egin zen fondo genetiko basatian eta beste bi proteinen gabezia (12. irudia; ikus E2 irudia). Aztertutako anduietan, fondo genetiko basatian zein bi nulu sinpleetan,  $\Delta$ *flpA* eta  $\Delta$ *stk47*, 51 kDa inguruan banda bat azaltzen zela ikusi zen (FlpB ~24 kDa + GFP ~27 kDa).  $\Delta$ *flpA* fondo genetikoan lortutako banda besteak baino argiagoa dela antzeman daiteke. Coomassie-ari erreparatuta, ordea, kolore argiagoa kargatutako proteina erauzkin kantitate txikiagoaren ondorio dela ikusten da. Beraz, lortutako emaitzetan

oinarrituta, FlpA eta Stk47 proteinen gabeziak FlpB-ren espresioan eduki zezakeen eraginik ez zen ikusi.

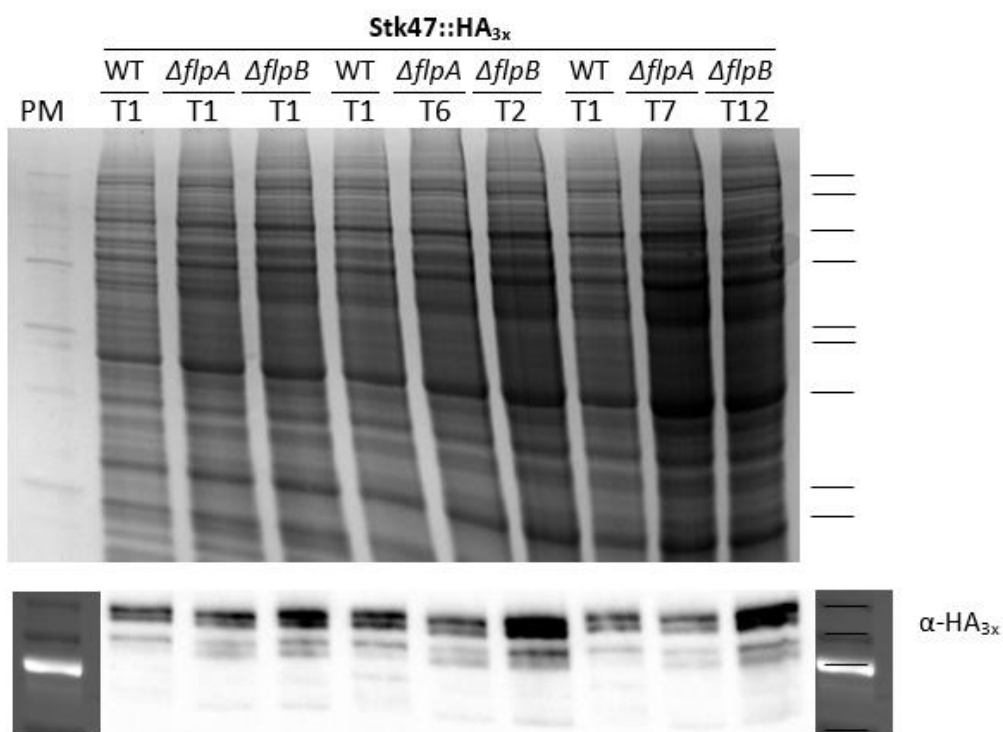


**12. irudia.** FlpA eta FlpB proteinen Western-Blot immunodetekzio bidez lortutako emaitzen errebelazioak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-arekin tindatutako gelaren irudia; behean, GFP markatzailearen aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren irudia. Erdialdean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikus daitezke. Ezkerraldean, *gdpA<sup>P</sup>::FlpA::GFP* kimerari dagozkion emaitzak, aurreko Westen-Blot-ean (E1 irudia) baieztatutako anduiak erabiliz: fondo genetiko basatian (BD1442),  $\Delta$ *stk47* nulu sinplean (BD1494) eta  $\Delta$ *flpB* nulu sinplean (BD1485). Hiru anduiek banda bana erakutsi zuten 67 kDa inguruan. Eskuinaldean, *FlpB::GFP* kimerari dagozkion emaitzak. Aztertutako anduiak hurrengoak izan ziren: fondo genetiko basatian T3 (BD1458),  $\Delta$ *flpA* fondo genetiko nuluan T1 (BD1468) eta  $\Delta$ *stk47* fondo nuluan T2 (BD1495). Kasu honetan, hiru anduientzat banda bana ikusi zen 51 kDa inguruan.

FlpA eta FlpB proteinekin egin zen moduan, *Stk47* proteinaren espresioa aztertu zen jarraian. Lehenik, GFP-rekin markatutako *Stk47*-ren anduiak aztertu ziren, GFP-ren aurkako antigorputzak erabiliz (ikus E3 irudia). Hainbat alditan errepikatu bazen ere, ez zen lortu inolako bandarik ikustea. Hau horrela, HA<sub>3x</sub>-rekin markatutako *Stk47* proteinarekin froga egin zen, markatzaile honen kontrako antigorputzak erabiliz (E3 irudia). Horretarako, dagokien anduiak sortu behar izan ziren (ikus material eta metodoak). Horrela, fondo genetiko basatian, anduietako batean (BD1448) bi banda azaldu ziren 111 kDa inguruko tamainan (bestea, BD1449, baztertu egin zen). Emaitza hori lortuta, FlpA eta FlpB proteinen faltan

Stk47-ren espresioarekin zer gertatzen zen aztertzea jo zen. Horretarako, Stk47::HA<sub>3x</sub>-ren konstrukzioak sortu ziren  $\Delta flpA$  eta  $\Delta flpB$  fondo genetiko nuluetan (ikus material eta metodoak). Jarraian, beste Western-Blot bat burutu zen, Stk47-ren espresioa fondo genetiko basatian zein bi nulu sinpleetan alderatzeko helburuarekin (13. irudia; ikus E4 irudia).

Lortutako emaitzetan (13. irudia), FlpA eta FlpB-ren gabezia Stk47-ren immunodetekzio banden patroia aldatzen dela ikusten da. Izan ere, fondo genetiko basatian, beheko banda (beheko banda parean) nabarmenki ahulagoa da  $\Delta flpA$  eta  $\Delta flpB$  nuluetan baino.

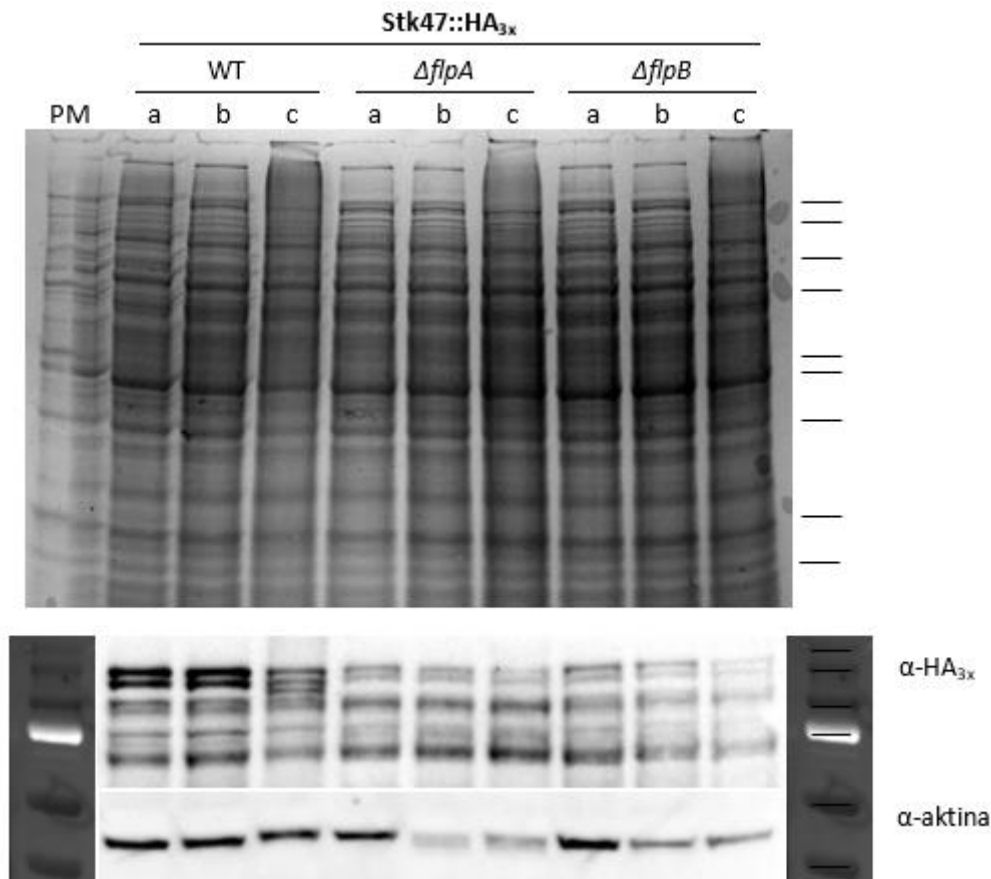


**13. irudia.** Stk47::HA<sub>3x</sub> proteinaren Western-Blot immunodetekzio bidezko azterketan lortutako emaitzak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-rekin tindatutako gelaren irudia; behean, HA<sub>3x</sub>-ren aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren irudia. Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikusten dira. Jarraian, aztertutako Stk47::HA<sub>3x</sub>-ren andui desberdinak azaltzen dira, beti ere fondo genetiko basatia  $\Delta flpA$  eta  $\Delta flpB$  fondo genetiko nuluekin alderatuz (hirunaka). Beheko banda pareari begiratuz, aldaketa ikus daiteke beheko bandan (beheko banda parean) fondo genetiko basatitik  $\Delta flpA$  zein  $\Delta flpB$  nuluetara, fondo basatian banda nabarmenki ahulagoa izanik bi nuluetan baino. Aztertutako anduiak: aurretik baieztatutako T1 andui basatia (BD1448);  $\Delta flpA$  fondoan T1 (BD1503), T6 (BD1504) eta T7 (BD1505);  $\Delta flpB$  fondoan T1 (BD1506), T2 (BD1507) eta T12 (BD1508).

Oro har, burututako Western-Blot proben emaitzak oinarritzat hartuz, Stk47-ren espresioak FlpA eta FlpB proteinekiko menpekotasuna zuela ikusi zen. Hiru proteina hauek konplexu bat osatzen dutela onartuz eta Stk47 ziklina menpeko kinasa bat izanik, FlpA ustezko ziklinaren gabeziak honen espresioan nolabait eragin zezakeela espero zen, edota zubi lana betetzen duen FlpB-ren faltak ere nolabaiteko eragina izan zezakeela. Lortutako emaitzek, alegia, hipotesi horrekin bat egiten dute.

FlpA eta FlpB proteinekin egindako frogetan, banda bakarra ikusi zen kasuan kasu esperotako tamainan. Stk47::HA<sub>3x</sub> kimeraren kasuan, ordea, bi banda pare azaltzen zirela ikusi zen (ikus 13. irudia). Gainera, beheko banda fondo genetiko basatitik nulu sinpleetara aldatzen zela antzeman zen. Hori kontuan hartuta, eta jakinda RNA polimerasa II-ren aktibitatea CTD (C-terminal) eremuaren fosforilazio bidez erregulatua dagoela, lortutako banda pareak fosforilazio posible baten ondorio izan zitezkeela pentsatu zen. Hipotesi hau frogatzeko, *lambda* fosfatasaren ( $\lambda$ PP) froga burutu zen.  $\lambda$  proteina fosfataza ( $\lambda$ PP),  $\lambda$  bakteriofagoaren proteina fosfatasari deritzo eta serina/treonina (Ser/Thre) proteina fosfataza familiaren barruan kokatzen da (Hoff et al., 1999).  $\lambda$  bakteriofagoaren ORF221 irakurketa markoaren (*open reading frame*) 221 aminoazidoko produktua da, hain zuzen ere. Entzima honek Mn<sup>2+</sup>-rekiko menpekotasuna du eta fosforilatutako serina, treonina eta tirosina hondarren gaineko fosfataza aktibitatea du (Cohen eta Cohen, 1989; Zhuo et al., 1993). Fosfataza hau vanadato ioien presentzian inhibitzen da, desfosforilazioa eragotziz. Izatez, banadatoa proteina-fosfotirosina fosfataza entzimen inhibitzaile moduan erabili ohi da (Gordon, 1991).

Fosfataza alkalinoaren frogan, Stk47::HA<sub>3x</sub>,  $\Delta flpA$ ; Stk47::HA<sub>3x</sub> eta  $\Delta flpB$ ; Stk47::HA<sub>3x</sub> kimeren andui bana aztertu zen, hiru tratamendu desberdinekin (14. irudia; ikus E5 irudia). Lehen laginari (a)  $\lambda$ PP tanpoia eta MnCl<sub>2</sub> besterik ez zitzaion gehitu. Bigarrenari (b), aurreko osagaiez gainera,  $\lambda$ PP entzima gehitu zitzaion. Honek, fosforilatutako serinaren gainean jokatzen du, hau desfosforilatuz. Hau da, lagin honek proteina desfosforilatuaren patroia erakutsi beharko luke. Azken laginak (c), banadatoa zuen gehituta, gainerako osagaiekin batera. Vanadato ioiek  $\lambda$  fosfataza entzima inhibitzen dute, desfosforilazioa eragotziz. Beraz, lagin honetan proteinaren hasierako egoerara itzuliko ginateke.



**14. irudia.** Stk47::HA<sub>3x</sub> proteinarekin burututako fosfatasa alkalinoaren frogan lortutako emaitzak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-rekin tindatutako gelaren irudia; behean, mintzaren irudia HA<sub>3x</sub>-ren aurkako antigorputzekin erasotu ondotik eta aktinaren aurkako antigorputzekin erasotu ondotik (kontrol moduan). Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikusten dira. Jarraian, Stk47::HA<sub>3x</sub>-ri dagozkion hiru andui aztertu ziren fondo basatian (BD1448), *ΔflpA* fondoan (BD1503) eta *ΔflpB* fondoan (BD1506). Andui bakoitzaren hiru lagin aztertu ziren, hiru tratamendu desberdinekin: (a) laginari λ fosfatasa (λPP) tanpoia eta MnCl<sub>2</sub> besterik ez zitzaion gehitu; (b) laginari, aurreko osagaiez gainera, λPP entzima gehitu zitzaion; eta (c) laginari λPP entzimaren inhibitzailea den sodio vanadatoa ere gehitu zitzaion, gainerako osagaiekin batera. Oro har, ez zen aldaketa esanguratsurik ikusi lagin batetik bestera. Fondo genetiko basatiko anduiaren (c) laginaren kasuan, hiru banda ikusi ziren 111 kDa inguruan bi beharrean. Emaitza honek, ordea, ez digu informazio esanguratsurik eskaintzen eta erroreren bati dagokiola pentsa dezakegu, vanadato ioien eraginez hasierako laginaren banda berberak ikusi beharko liratekeelarik.

14. irudian ikus daitekeen moduan, fosfatasa alkalinoaren frogan lortutako emaitzak ez ziren aurretik esperotakoak izan. Entzima gehitutako laginetan (b), hasierako laginetan (a) ikusten ziren banda berberak azaldu ziren, eta ez zen inolako desfosforilazio patroirik ikusi. Entzimaren inhibitzailea gehitu zitzaian laginetan (c) ere banda berak aztertu ziren, fondo genetiko basatiko anduiaren



kasuan izan ezik. Hemen, izan ere, 111 kDa inguruan hiru banda azaldu ziren bi banda beharrean. Hala ere, lagin horrek vanadato ioiak edukirik, entzimaren inhibizioa gertatu beharko litzateke eta, desfosforilazioa eragotzita, hasierako patroi bera eduki beharko genuke. Ondorioz, lortutako hiru bandentzat ez zen kausa argirik ikusi. Hau horrela, burututako  $\lambda$  fosfatasaren frogan oinarrituz, ezin izan ziren esperotako fosforilazio eta desfosforilazio patroiak baieztatu Stk47 ustezko kinasarentzat.

### **FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen ustezko funtzioa, osa lezaketen konplexua eta elkarren arteko menpekotasuna**

RNA polimerasa II-k burutzen duen transkripzio prozesua ziklina-menpeko kinasa (CDK) desberdinen bidez erregulatua dago (Xie et al., 2021). Hauek CDK-ziklina konplexuak osatzen dituzte, fosforilazio eta desfosforilazio bidez erregulatuak daudenak (Lees, 1995).

Karagiannis et al., (2007) lanean, *S. pombe* onddoan lokalizazio nuklearra zuen Lsk1p (Ctk1) kinasaren ziklina kidea, Lsc1p (Ctk2), identifikatu zuten. Bi hauek elkarrekin kokatzen dira nukleoan eta konplexu bat osatzen dute *in vivo*. Lsk1p kinasak ziklina-menpeko kinasa (CDK) azpitalde batekiko homologia nabarmena erakusten zuela ikusi zuten. CDK horiek RNA polimerasa II-ren C-terminal eremuaren (CTD) azpiunitate nagusia (Rpb1p) fosforilatzen dute. Azpiunitate hau YSPTSPS heptapeptidoaren errepikapenez osatua dago eta Ser-2 zein Ser-5 erresidualetan fosforilatu daiteke. CTD-ak funtzio erregulatzailerako garrantzitsuak betetzen ditu transkripzio prozesuan, honen fosforilazio egoerak berebiziko garrantzia duelarik (Prelich, 2002). Aipaturiko lanean, Lsk1p-Lsc1p kinasa-ziklina konplexua Rpb1p-ren CTD-aren Ser-2 fosforilaziorako beharrezkoa zela frogatu zuten (Karagiannis et al., 2007). Alde batetik, Lsk1p kinasa eta Lsc1p ziklina, biak nukleoan ko-lokalizatzen zirela ikusi zen. Gainera, Lsc1p-ren kokapena behatzean  $\Delta lsk1$  mutantean, hau zitoplasman banatuta aurkitu zen, nukleora garraiatzeko eta bertan pilatzeko gai ez izanik. Beraz, lortutako emaitzek iradoki zuten Lsk1p (Ctk1) kinasa aktibitatea ezinbestekoa zela Lsc1p (Ctk2)-ren kokapen nuklearrerako zein Lsk1p-Lsc1p konplexuaren eraketarako.

Ildo horretatik, iaz argitaratutako “*Structure and activation mechanism of the yeast RNA Pol II CTD kinase CTDK-1 complex*” lanean, *S. pombe* onddoan CTDK-1 konplexua ezaugarritu zen eta honen osagai ziren hiru azpiunitateak definitu ziren (Xie et al., 2021).  $\alpha$  azpiunitatea Ctk1 (Lsk1) proteinari dagokio eta ziklina menpeko kinasa (CDK) bat da;  $\beta$  azpiunitatea Ctk2 (Lsc1) ziklina bat da; eta  $\gamma$  azpiunitatea Ctk3 (Lsg1) proteinari dagokio. Aipaturiko lanean, azken proteina horrek Ctk1 eta Ctk2 azpiunitateen arteko zubi funtzioa eduki zezakeela proposatu zen, CTDK-1 konplexuaren egonkortasunean jardunez (Xie et al., 2021). FlpA proteina Ctk-2

(Lsc1) ziklinaren ortologoa izanik *A. nidulans* onddoan, Ctk-1 (Lsk1) kinasaren eta Ctk-3 (Lsg1) zubi lana egin lezakeen proteinaren ortologoak bilatu ziren. Horrela, FlpA-rekin CTDK-1 motako konplexua osa lezaketen Stk47 kinasaren eta FlpB proteina identifikatu ziren. Hiru proteina horien arteko interakzioak aztertu ondotik, Karagiannis et al. (2007) lanean *S. pombe*-rentzat lortutako emaitzak ez dira mantentzen *A. nidulans* onddoan. Bertan, Lsc1p (Ctk2) ziklinaren kokapen nuklearra Lsk1p (Ctk1) kinasaren menpekoa zela ikusi zuten. Lan honetan, ordea, aurkako menpekotasuna ikusi da *A. nidulans* espeziean, hots, Stk47 kinasaren kokapen nuklearra FlpA ziklinaren menpekoa zela (Lsk1p eta Lsc1p-ren ortologoak, hurrenez huren). Izan ere, fluoreszentsia mikroskopia bidez lortutako irudiek Stk47 kinasak FlpA-ren gabezia lokalizazio nuklearra galtzen zuela erakutsi zuten, nukleoan lokalizatzeko FlpA-ren beharra zuela iradokiz. Honek zentzua du Stk47 ziklina-menpeko kinasaren bat dela onartuz gero, honen aktibitatea ziklina batek (kasu honetan, FlpA-k) erregulatuko lukeelarik.

Emaitza hauek aurretik egindako azterketa preliminarrekin eta proposatutako ereduarekin bat datoz, non FlpA ziklinak, Stk47 ziklina-menpeko kinasak eta zubi lana egin lezakeen FlpB proteina CTDK-1 motako konplexu bat osatuko luketen, RNA polimerasa II-ren aktibitatearen erregulazioan funtzio garrantzitsua beteko lukeena. FlpB-ren funtzioa eta azpiunitate honen ezinbestekotasuna, ordea, oraindik guztiz argitzeke daude. Xie eta kideen lanean proposatu bezala, FlpB-k FlpA eta Stk47-ren arteko zubi lana egingen balu, pentsa zitekeen honen gabezia ere Stk47 kinasak lokalizazio nuklearra galduko lukeela. Lan honetan, aldiz,  $\Delta flpB$  mutante nuluak Stk47-ren kokapen nuklearra mantendu egin zen. Hala ere, immunodetekzio proban Stk47-ren espresioa FlpA zein FlpB-ren gabezia aldatzen zela ikusi zen, hauen arteko nolabaiteko interakzioa iradokiz eta proposatutako ereduarekin bat etorritz. Hala eta guztiz ere, egindako azterketaren jarraipena beharrezkoa izango da proteina honi buruz, eta osotara intereseko konplexuaren funtzionamenduari buruz, ezagutza sakonago bat edukitzeko.

### **RNA Pol II-ren CTD-ren fosforilazioaren garrantzia transkripzioaren kontrolean**

Aipatu bezala, RNA polimerasa II-ren azpiunitate handiaren CTD-ren fosforilazioak zeregin garrantzitsua du honen erregulazioan. Izatez, Karagiannis eta

kideen lanean CTD-ren heptapeptidoaren Ser-2 fosforilazioak zitokinesiaren erregulazioan garrantzizko funtzio fisiologikoa betetzen duela ondorioztatu zuten, Ser-2 fosforilazio mailaren erredukzioak kalteak eragiten zituelarik (Karagiannis et al., 2007). Aipaturiko lanean, gainera, Ser-2 fosforilazioan eman daitezkeen aldaketa txikiak, Western Blot-en detekzioaren erresoluziotik ihes egin dezaketinak, eragin fisiologiko bat edukitzeko nahikoa izan litezkeela susmatu zen (Karagiannis et al., 2007). Hala ere, *S. pombe* onddoan egindako lanean ikusi zen CTD-ren fosforilazioaren alterazioek ez zutela zertan transkripzioaren maila totalean efektu orokorrik eduki behar (Karagiannis et al., 2007).

Hernández-Ortiz eta Espesok 2013an argitaratutako lanean, kaltzineurina (CaN) fosfatasaren aktibitatea aztertu zen (kaltzioaren menpeko serina/treonina motako fosfatasata bat). *S. cerevisiae* espeziean, fosfatasata honek Crz1p (*calcineurin-regulated zinc-finger factor 1*) deituriko transkripzio faktorearen bitartekari lana egiten du. Crz1p-ren erregulazioak fosforilatutako forma desberdinen existentzia iradokitzen du, zeinak elektroforesian duten mugikortasun desberdinengatik bereiz daitezkeen (Stathopoulos-Gerontides et al., 1999). CrzA, Crz1p-ren ortologoa da *Aspergillus nidulans* onddoan, eta kaltzineurina fosfatasak positiboki eragiten du TF hau nukleora garraiatzen. Aipaturiko lanean, CrzA transkripzio faktorearen fosforilazio formak aztertu ziren. Horrela, kaltzineurina erabiliz, fosforilatutako formek mugikortasun desberdina zutela ikusi zen, eta hau kaltzineurinarekin inhibitzaile bat erabiliz baieztatu zen, desfosforilazio frogak eginez. Lambda fosfatasarekin ( $\lambda$ PP), baldintza egokietan, CrzA-ren mugikortasuna handitzen zela ikusi zen. Bide beretik, gradu amaierako lan honetan, *A. nidulans* onddoaren Stk47 kinasaren fosforilazio patroiak aztertzeko saiakera egin da  $\lambda$ PP erabiliz. Egindako frogetan, ordea, ez da inolako aldaketarik ikusi proteinarekin mugikortasunean eta, beraz, ezin izan da fosforilazio patroirik identifikatu. Hala eta guztiz ere, kontuan hartu behar da, Stk47 proteinarekin tamaina dela eta, lortutako bandak tamaina oso altutan agertzen direla. Hortaz, bandak destolestuta egoteak ziurrenik beste modifikazioen bat dagoela esan nahi du, fosfato talde baten edo batzuen gehikuntzak emango lukeen pisu aldaketak ez lukeelako elektroforesian mugikortasunaren aldaketa handirik eragingo. Dena den,  $\lambda$ PP-ren azterketak fosforilaziorik azaldu ez zuen arren, Eduardo Espesok eginiko fosfoproteoma proban lortutako emaitzek (argitaratu gabek) Stk47 fosforilatua zegoela erakutsi zuten, hiru sekuentzia desberdinetan

kokatutako serina aminoazidoan (HDPsPEPVKR sekuentziaren Ser-4 (%100eko probabilitatea); REDsPSAPPFKR sekuentziaren Ser-4 (%89.2) eta Ser-6 (%10.8); eta FSsPQRDAsASR sekuentziaren Ser-2 (%8.5), Ser-3 (%91.5) eta Ser-9 (%99.9)). Beraz, Stk47 proteinaren fosforilazio bandak identifikatzeak etorkizunerako helburuetako bat izaten jarraitzen du. Oro har, argi dago fosforilazioak berebiziko funtzioa betetzen duela transkripzio prozesuan eta *A. nidulans*-en garapen asexuala kontrolatzen duten proteinen fosforilazio patroiak ezagutzeak aurrerapausu bat suposatuko duela ikerketa-lerro honetan.

## ONDORIOAK

Atal honetan, FlpA, Stk47 eta FlpB proteinen eta hauen arteko interakzio posibleen inguruan egindako analisi bioinformatikoan lortutako emaitzetatik ateratako ondorioak zerrendatuko dira:

- Aurretik egindako azterketa preliminarrekin bat, lan honetan lortutako emaitzek FlpA ziklinak Stk47 ziklina-menpeko kinasarekin (CDK) eta bien arteko zubi funtzioa bete lezakeen FlpB hirugarren proteina batekin CTDK-1 motako konplexua osatzen duela iradokitzen dute.
- FlpA, Stk47 eta FlpB proteinek lokalizazio nuklearra dute. Stk47 kinasak FlpA ziklinaren beharra du nukleora garraitu eta bertan pilatzerako orduan. Kontrakoa espero zen arren, FlpB-k ez du FlpA-rekiko menpekotasunik erakutsi nukleoan lokalizatzerako garaian. Eta FlpA-k ere ez du dependentziarik FlpB eta Stk47-rekiko.
- Aztertutako hiru proteinetako baten gabeziak ez du eragin kaltegarriarik eduki gainerako bien kontzentrazioan, baina FlpA edo FlpB-ren gabezian, Stk47-ren immunodetekzio banden patroia aldatu egiten da, banda horien naturaren inguruan informaziorik oraindik ez dagoen arren.

## CONCLUSIONS

The conclusions obtained from the results of the bioinformatic analysis of FlpA, Stk47 and FlpB proteins and the potential interactions between them are listed below:

- In accordance with the previous preliminary studies, the results obtained in this work suggest that the cyclin FlpA forms a CTDK-1 complex together with the cyclin-dependent kinase (CDK) Stk47 and a third FlpB protein that could act as a bridge between the former two.
- FlpA, Stk47 and FlpB show nuclear localization. The cyclin FlpA is required for Stk47 to be transported into and accumulated in the nucleus. In contrast to what was expected, FlpB did not show any dependence on FlpA when

localizing in the nucleus. FlpA does not show any dependence on either Stk47 or FlpB.

- The absence of one of the proteins of interest did not affect the concentration of the other two, but the pattern of the immunodetection bands of Stk47 is altered with the absence of FlpA or FlpB, even though there is not enough information yet about the nature of those bands.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
- Agirrezabala, Z. (2021). *Aspergillus nidulans* onddoaren garapenaren kontrol genetikoa: FlpA usteko ziklinaren identifikazioa eta ezaugarritze funtzionala. Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentziako itsas Estazioa (PiE-EHU).
- América, H.-A., & A, P. M. (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. <https://doi.org/10.1128/EC.00119-10>
- Andrianopoulos, A., & Timberlake, W. E. (1991). ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *The Plant Cell*, 3(8), 747.
- Bat-Ochir, C., Kwak, J.-Y., Koh, S.-K., Jeon, M.-H., Chung, D., Lee, Y.-W., & Chae, S.-K. (2016). The signal peptide peptidase SppA is involved in sterol regulatory element-binding protein cleavage and hypoxia adaptation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 100(4), 635–655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.13341>
- Bayram, O., Bayram, Ö., Valerius, O., Park, H.-S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., & Braus, G. (2010). LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for Light-Dependent Development and Fungal Cell-Type Specificity. *PLoS Genetics*, 6, e1001226. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001226>
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R., & Timberlake, W. E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(9), 3113–3118. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.9.3113-3118.1987>
- Cohen, P. T. W., & Cohen, P. (1989). Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage  $\lambda$ . Probable identity with open reading frame 221. *Biochemical Journal*, 260(3), 931–934. <https://doi.org/10.1042/bj2600931>
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Grigoriev, I. v. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology*, 18(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2019). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), 5-22. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00064-6>
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E. A., & Ugalde, U. (2010). *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology*, 18(12), 569–576. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.007>
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N. J., Fischer, R., Yu, J. H., Ugalde, U. (2008). Basic-Zipper-Type Transcription Factor FlbB Controls Asexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 38–48. <https://doi.org/10.1128/EC.00207-07>
- Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L.-J., Cuomo, C. A., & Birren, B. (2005). Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Research*, 15(12), 1620–1631.
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., & Hurrell, J. G. R. (2011). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Cell Biology*, 52(1), 6.2.1-6.2.28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0602s52>



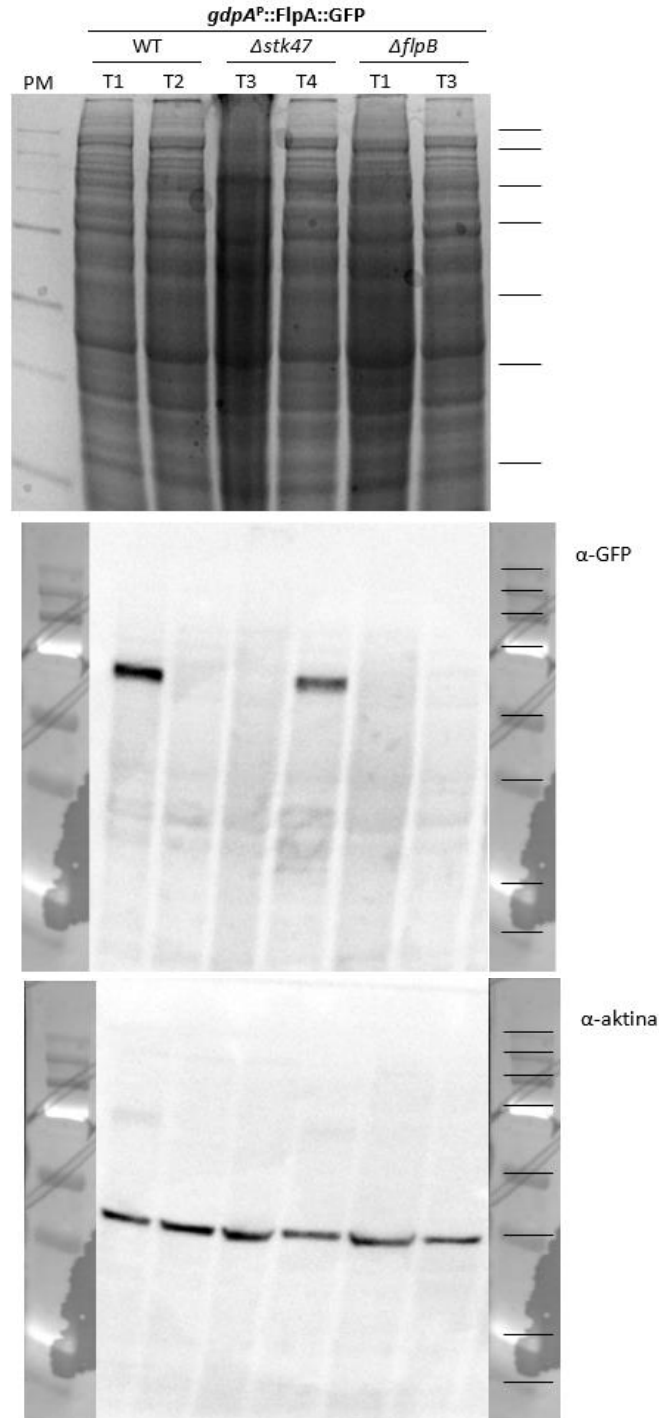
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E. A., & Ugalde, U. (2009). *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Molecular Microbiology*, 71(1), 172–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06520.x>
- Gordon, J. A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods in Enzymology* (Vol. 201, pp. 477–482). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)01043-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)01043-2)
- Gregory, P. (2002). RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Kinases: Emerging Clues to Their Function. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 153–162. <https://doi.org/10.1128/EC.1.2.153-162.2002>
- Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R., & Hempel, D. C. (2005). Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), 375–384. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0213-5>
- Herrero-Garcia, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Cortese, M. S., Markina-Iñarrairaegui, A., Oiartzabal-Arano, E., Etxebeste, O., Ugalde, U., & Espeso, E. A. (2015). Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Molecular Microbiology*, 98(4), 607–624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.13156>
- Hoff, R. H., Mertz, P., Rusnak, F., & Hengge, A. C. (1999). The Transition State of the Phosphoryl-Transfer Reaction Catalyzed by the Lambda Ser/Thr Protein Phosphatase. *Journal of the American Chemical Society*, 121(27), 6382–6390. <https://doi.org/10.1021/ja990667p>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karagiannis, J., & Balasubramanian, M. K. (2007). A cyclin-dependent kinase that promotes cytokinesis through modulating phosphorylation of the carboxy terminal domain of the RNA Pol II Rpb1p sub-unit. *PloS One*, 2(5), e433.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. *Western Blotting: Methods and Protocols* (pp. 17–30). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5)
- Lees, E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 773–780. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80060-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80060-3)
- Lin, Y., Leena, U., Aysha, O., Francis, N., Jonathan, D., C. D. S. C. P., Xiaowei, D., Ariadna, P.-B., & A, O. S. (2004). Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1359–1362. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004>
- Marshall, M. A., & Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 11(1), 55–62.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Nguyen, T. A., Cissé, O. H., Yun Wong, J., Zheng, P., Hewitt, D., Nowrousian, M., Stajich, J. E., & Jedd, G. (2017). Innovation and constraint leading to complex multicellularity in the *Ascomycota*. *Nature Communications*, 8(1), 14444. <https://doi.org/10.1038/ncomms14444>

- Oiartzabal-Arano, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2016). Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 62(2), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0556-0>
- Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., Huang, Z., Park, H.-S., Yu, J.-H., & Cánovas, D. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the *aspergilli*. *Studies in Mycology*, 91(1), 37–59.
- Otamendi, A., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Oiartzabal-Arano, E., Cortese, M. S., Espeso, E. A., & 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*, 76(21), 4369–4390. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03121-5>
- Peñalva, M. A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology*, 42(12), 963–975. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.09.004>
- Petersen, J. H. (2013). *The Kingdom of Fungi*. Princeton University Press. <https://doi.org/doi:10.1515/9781400846870>
- Rodríguez-Urra, A. B., Jiménez, C., Nieto, M. I., Rodríguez, J., Hayashi, H., & Ugalde, U. (2012). Signaling the Induction of Sporulation Involves the Interaction of Two Secondary Metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chemical Biology*, 7(3), 599–606. <https://doi.org/10.1021/cb200455u>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J., & Cyert, M. S. (1999). Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes & Development*, 13(7), 798–803.
- Sterner, D. E., Lee, J. M., Hardin, S. E., & Greenleaf, A. L. (1995). The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5716–5724. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5716>
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), 3111–3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Kocsubé, S., O’Gorman, C. M., & Dyer, P. S. (2014). *Aspergillus*: Sex and Recombination. *Mycopathologia*, 178(5), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9795-8>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Welinder, C., & Ekblad, L. (2011). Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1416–1419. <https://doi.org/10.1021/pr1011476>

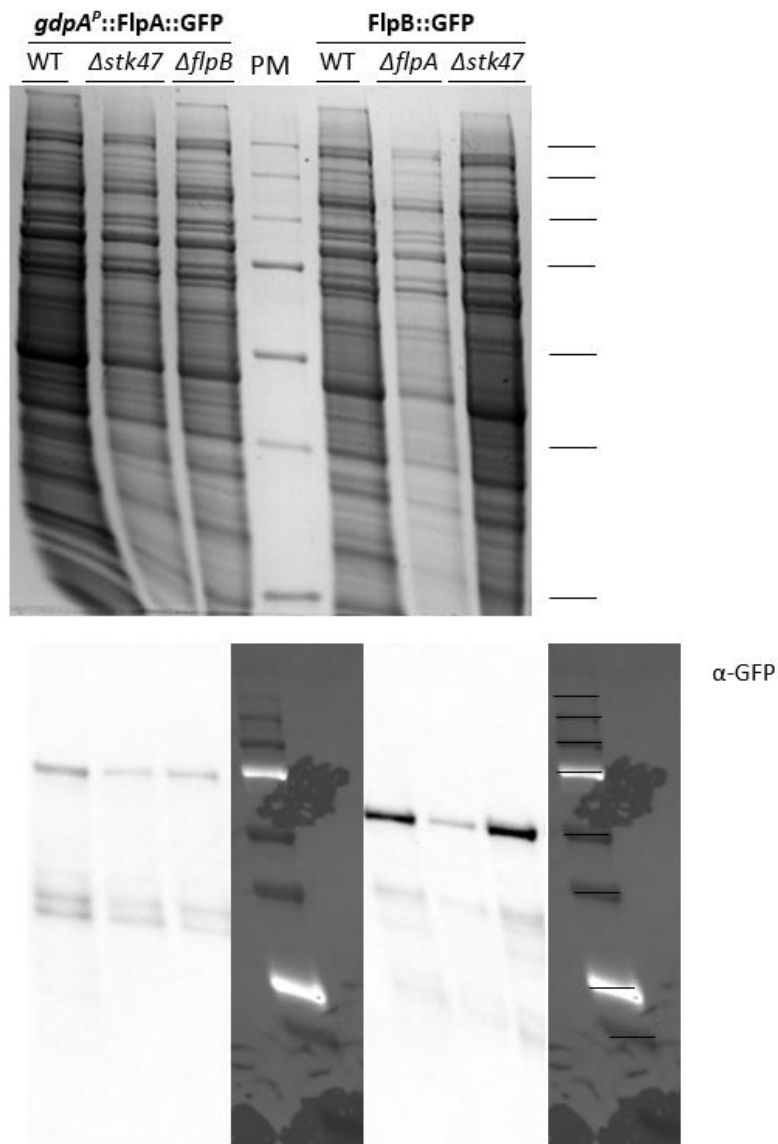
- Wieser, J., Lee, B. N., Fondon, J. W., & Adams, T. H. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 27(1), 62–69. <https://doi.org/10.1007/BF00326580>
- Xie, Y., Lord, C. L., Clarke, B. P., Ivey, A. L., Hill, P. S., McDonald, W. H., Ren, Y. (2021). Structure and activation mechanism of the yeast RNA Pol II CTD kinase CTDK-1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(3), e2019163118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019163118>

## ERANSKINAK

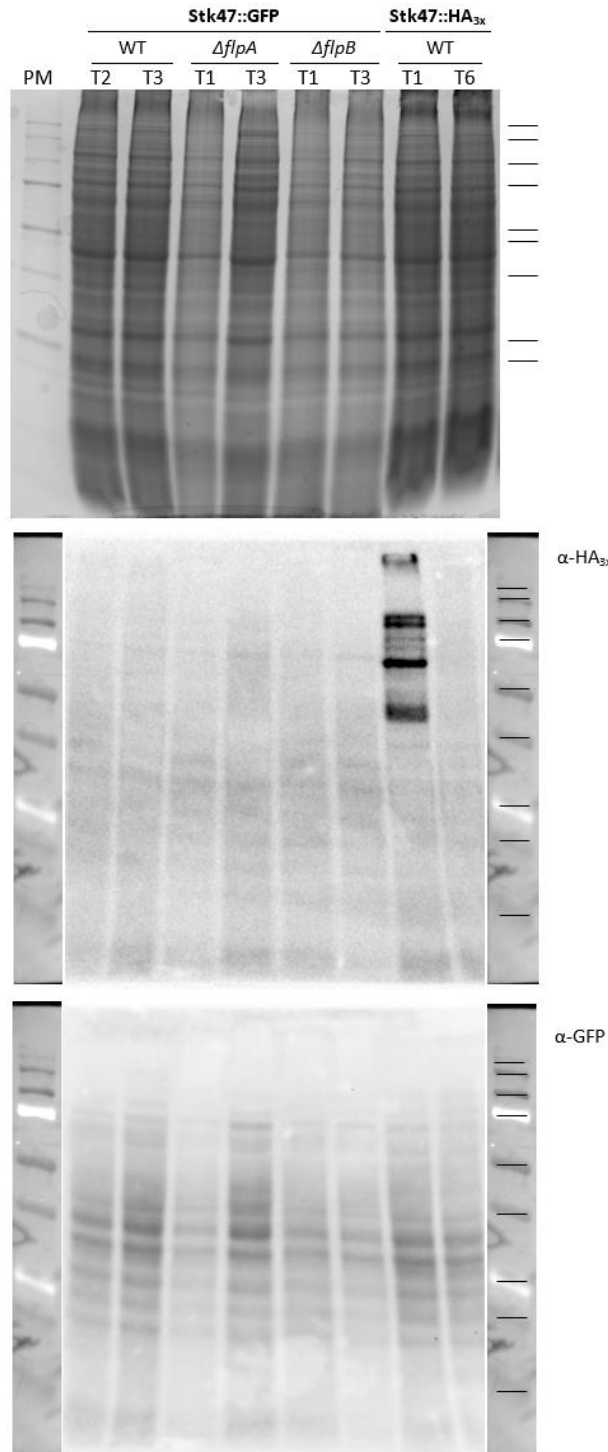
**E1 irudia.** *gdpA<sup>P</sup>::FlpA::GFP*-ren Western-Blot immunodetekzio bidez lortutako errebelazioak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-arekin tindatutako gelaren irudia; erdian, mintzaren irudia GFP markatzailearen aurkako antigorputzekin inkubatu ondotik; eta behean, mintzaren irudia aktinaren aurkako antigorputzekin inkubatu ondotik. Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzailea. Jarraian, FlpA proteinaren aztertutako andui desberdinak ikus daitezke. Aztertutako anduiak: fondo genetiko basatian (WT) T1 (BD1442) eta T2 (BD1443);  $\Delta$ *stk47* fondo genetiko nuluan T3 (BD1493) eta T4 (BD1494); eta  $\Delta$ *flpB* fondo genetiko nuluan T1 (BD1482) eta T3 (BD1484).



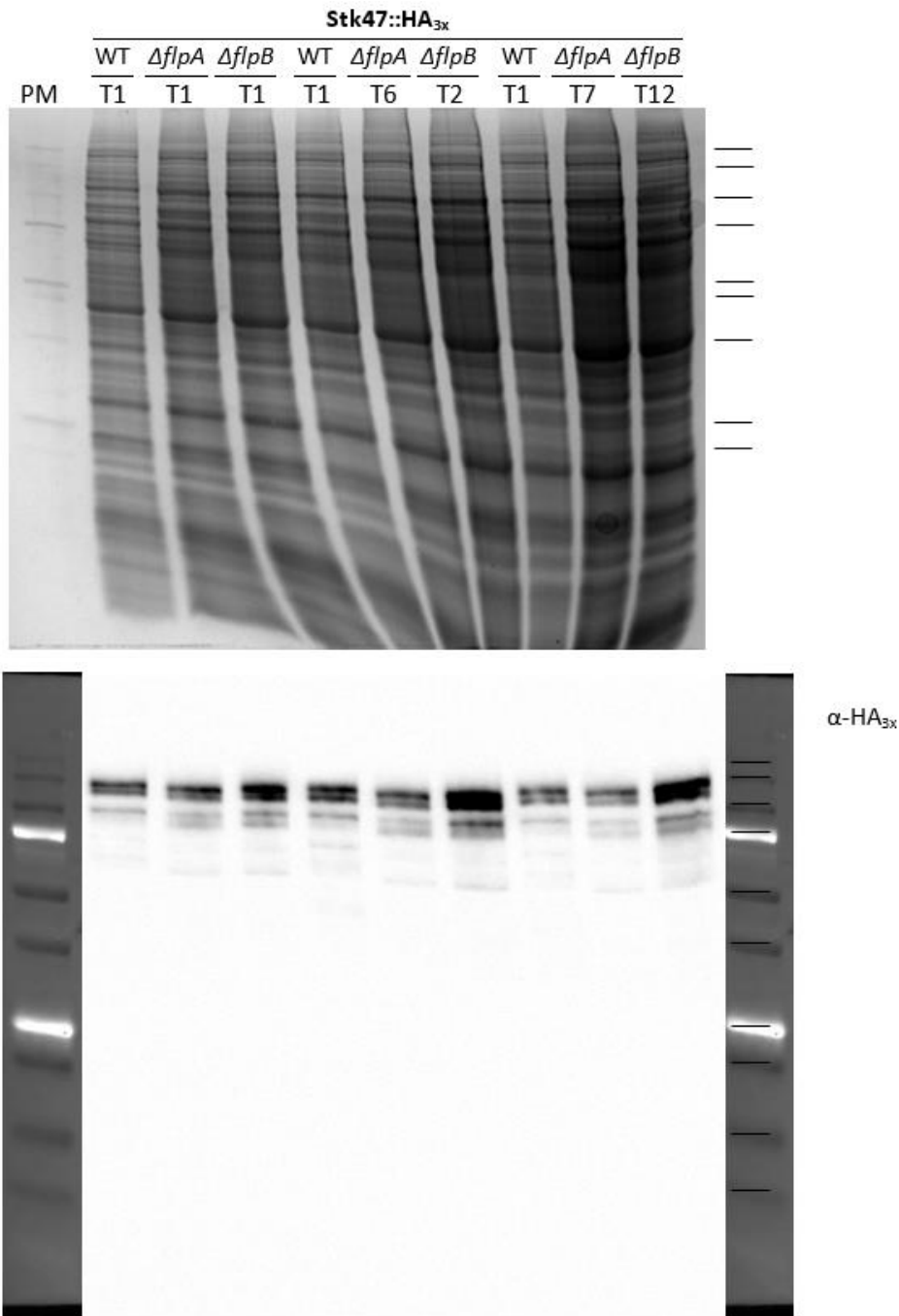
**E2 irudia.** FlpA eta FlpB proteinen Western-Blot immunodetekzio bidez lortutako emaitzen errebelazioak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-arekin tindatutako gelaren irudia; behean, GFP markatzailearen aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren irudia. Erdialdean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikus daitezke. Ezkerraldean, *gdpA<sup>P</sup>::FlpA::GFP* kimerari dagozkion emaitzak, aurreko Westen-Blot-ean baieztatutako anduiak erabiliz: fondo genetiko basatian (BD1442),  $\Delta$ *stk47* nulu sinplean (BD1494) eta  $\Delta$ *flpB* nulu sinplean (BD1485). Eskuinaldean, FlpB::GFP kimerari dagozkion emaitzak. Aztertutako anduiak hurrengoak izan ziren: fondo genetiko basatian T3 (BD1458),  $\Delta$ *flpA* fondo genetiko nuluan T1 (BD1468) eta  $\Delta$ *stk47* fondo nuluan T2 (BD1495).



**E3 irudia.** Stk47 proteinaren Western-Blot immunodetekzio bidez lortutako emaitzak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-rekin tindatutako gelaren irudia; erdian, HA<sub>3x</sub> markatzailearen aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren erbelazioaren irudia; behean, GFP-ren aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren irudia. Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikusten dira. Jarraian, GFP-rekin markatutako Stk47 proteinaren andui desberdinak azaltzen dira: fondo genetiko basatian T2 (BD1451) eta T3 (BD1452);  $\Delta flpA$  fondo genetiko nuluan T1 (BD1464) eta T3 (BD1466); eta  $\Delta flpB$  fondo genetiko nuluan T1 (BD1477) eta T3 (BD1479). Eskuinaldean, Stk47::HA<sub>3x</sub>-kimerarekin aztertutako anduiak: T1 (BD1448) eta T6 (1449).



**E4 irudia.** Stk47::HA<sub>3x</sub> proteinaren Western-Blot immunodetekzio bidezko azterketan lortutako emaitzak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-rekin tindatutako gelaren irudia; behean, HA<sub>3x</sub>-ren aurkako antigorputzekin erasotutako mintzaren irudia. Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak ikusten dira. Jarraian, aztertutako Stk47::HA<sub>3x</sub>-ren andui desberdinak azaltzen dira, beti ere fondo genetiko basatia  $\Delta flpA$  eta  $\Delta flpB$  fondo genetiko nuluekin alderatuz.. Aztertutako anduiak: aurretik baieztatutako T1 andui basatia (BD1448);  $\Delta flpA$  fondoan T1 (BD1503), T6 (BD1504) eta T7 (BD1505);  $\Delta flpB$  fondoan T1 (BD1506), T2 (BD1507) eta T12 (BD1508).



**E5 irudia.** Stk47::HA<sub>3x</sub> proteinarekin burututako fosfatasa alkalinoaren frogan lortutako emaitzak biltzen dituen irudia: goian, Coomassie-rekin tindatutako gelaren irudia; behean, mintzaren irudia HA<sub>3x</sub>-ren aurkako antigorputzekin erasotu ondotik eta aktinaren aurkako antigorputzekin erasotu ondotik (kontrol moduan). Ezkerraldean, pisu molekularreko markatzaileari dagozkion bandak. Aztertutako hiru anduiak: fondo basatian (BD1448), *ΔflpA* fondoan (BD1503) eta *ΔflpB* fondoan (BD1506). Andui bakoitzaren hiru lagin aztertu ziren, hiru tratamendu desberdinekin: (a) laginari λ fosfatasa (λPP) tanpoia eta MnCl<sub>2</sub> besterik ez zitzaion gehitu; (b) laginari, aurreko osagaiez gainera, λPP entzima gehitu zitzaion; eta (c) laginari λPP entzimaren inhibiltzailea den sodio vanadatoa ere gehitu zitzaion, gainerako osagaiekin batera.

