

Biokimika II
Kimika Aplikatua
Kimika Fakultatea
Donostia



Dinámica celular y control de la expresión génica del regulador de la conidiación de *Aspergillus nidulans* FlbB.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Bioquímica por,

Elixabet Oiartzabal Arano

Donostia

2016

Directores de Tesis Doctoral:

Oier Etxebeste

Unai O. Ugalde

Profesor Adjunto

Profesor Titular

Facultad de Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias Químicas

EHU/UPV

EHU/UPV



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

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos del Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto BFU2010-17528, del Gobierno Vasco a través del proyecto IT599-13, por la UPV/EHU a través del proyecto EHUA15-08 y por una beca del Programa para Formación de Personal Investigador de la UPV/EHU a la doctoranda **Elixabet Oiartzabal Arano**.

ESKERRAK/AGRADECIMIENTOS:

Lizentziatura amaitu eta laborategian hasi nintzenetik, asko izan dira pasa ditudan momentu on eta baita txarrak ere, eta momentu horietan guztietan nire inguruan egon den jendeari asko diot eskertzeko, bai arlo akademikoan eta baita pertsonalean ere. Esker horiek orrialde hauetan islatzea oso zaila egiten zait, batez ere hitzak soilik ez direlako nahikoa eskertzeko dudana adierazteko. Baina saiakerak merezi du.

Lehenik eta behin, nire doktorego tesiaren zuzendari izan diren bi irakasleak izendatu nahiko nituzke, Unai Ugalde eta Oier Etxebeste. Eskerrak eman nahi dizkizuet bioi laborategi honetako familiaren parte izaten utzi eta doktorego tesi proiektua aurrera eramateko nigan konfiantza izateagatik. Zuei esker zientzia eta ikerketaren mundua barrutik ezagutu eta bere parte izateko aukera izan dut, bai akademikoki eta bai pertsonalki balio handiko ikasketa izan dudana. Gainera egunerokotasunean zuen lanerako konstantzia eta grina eredu izan ditut nire bidean, baita beti aurrera jarraitzeko kemena ere. Beraz, eskerrik asko transmititu didazuen ezagutza guztia eta lanean emandako ereduarengatik!

Desde que terminé la licenciatura y comencé en el laboratorio, han sido muchos los buenos y malos momentos transcurridos, y tengo mucho que agradecer a la gente que ha estado cerca de mí en todos esos momentos, tanto en el campo académico como en el personal. Reflejar éste agradecimiento en estas páginas se me hace difícil, sobre todo porque la utilización sólo de palabras no es suficiente para expresarlo. Pero merece la pena intentarlo.

Primero, querría nombrar a mis dos directores de tesis doctoral, Unai Ugalde y Oier Etxebeste. Os quiero dar las gracias a los dos por haberme dejado ser parte de la familia que es este laboratorio y por haber depositado en mí la confianza para realizar este proyecto de tesis doctoral. Gracias a vosotros he podido conocer por dentro el mundo de la ciencia y la investigación, y formar parte de él, aprendizaje que ha sido de gran valor para mí, tanto en lo académico como en lo personal. Vuestra constancia en el trabajo ha sido ejemplo para mí, y también el ímpetu para seguir siempre adelante. ¡Por lo tanto, muchas gracias por todo el conocimiento que me habéis transmitido y el ejemplo dado en el trabajo!

Bigarrenik, doktorego tesiko urte hauetako momentu ezberdinetan asko lagundu nauten eta irakatsi nauten Edu, Aitor, Ane, Marc eta Erika aipatu nahiko nituzke. Bostoi eskertu nahi dizuet zuen ezagutzak nirekin partekatzeke izan duzuen eskuzabaltasuna eta edozein zalantza argitzeko betiere prest aurkeztea. Mila esker irakatsitako guztiagatik eta eskainitako laguntza guztiarengatik!

Laborategiko kideei zer esan. Urte hauetan uko- uko zuen alboan lanean egoteagatik zorte handia izan dut. Elkarrekin momentu onak pasa ditugu eta frustrazio momentuak ere. Baina bene-benetan, eskerrak eman nahi dizkizuet orain nahiz aurretik egon baina jada ez dauden kideei, guztien artean sortutako lanerako giro on eta jatorragatik. Egunerokotasunean berebiziko garrantzia izan duen laguntasunezko giro honegatik ez balitz, ziur nago urte hauek askoz ere gogorragoak izango lirakeela. Beraz, eskerrik asko eta ez aldatu inoiz!

En segundo lugar, quiero agradecer a Edu, Aitor, Ane, Marc y Erika la ayuda y enseñanzas que me han prestado en muchos momentos durante estos años de tesis doctoral. Os quiero agradecer a los cinco la generosidad de compartir conmigo vuestros conocimientos y la disponibilidad que siempre habéis mostrado. ¡Muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado y por toda la ayuda ofrecida!

¡Qué decir a los compañeros del laboratorio! He tenido una gran suerte por trabajar codo con codo con vosotros estos años. Hemos pasado juntos buenos momentos y también momentos de frustración. Pero, de verdad, quiero dar las gracias tanto a los ahora presentes como a los compañeros que ya no están, por el excelente ambiente de trabajo creado entre todos. Si no fuera por el ambiente amistoso que tenemos en el laboratorio día a día, algo de extraordinaria importancia para mí, estoy seguro de que estos años habrían sido mucho más duros. ¡Por lo tanto, muchas gracias y no cambiéis nunca!

Ezin ditut utzi aipatu gabe Biologiako Laborategiko eta Madrileko CIB-ko kideak ere, ezta bide honetan nire galderak erantzun eta laguntzeko denbora hartu duten zientzia munduko langile nekaezin oro ere. Ezta noski, Pablo Hernandez marrazkigile handia eta lan honen azalaren egilea ere. Zuengandik jasotako lagunartekotasuna eta lanerako kolaborazioagatik eskerrik asko!

Baita ere, eskerrak eman nahi dizkiet nire familiakoei eta bereziki guraso eta nebari, beti sostengatu nautelako ibilbide honetan. Arazoak erlatibizatzen eta nire buruan konfiantza mantentzen lagundu nauzue behin eta berriz. Eta zuri ere eskerrak Jatxu, beti ahal izan duzun guztian lagundu nauzulako eta nire aurpegian beti irria jartzen saiatu izan zarela. Nere euskarri izan zarete!

Nere lagunei ere guztiagatik bihotzez eskerrak. Momentu eta modu ezberdinetan guztiok asko lagundu bainauzue bide honetan eta beti, edozertarako, hor zaudete. Zuekin egondako une guztiek beti lagundu naute arnasa hartu eta indarrak berreskuratzeko. Eskerrik asko beraz momentu guzti horientatik!

No puedo dejar sin mencionar a los miembros del Laboratorio de Biología de la facultad y del CIB de Madrid, ni tampoco, a todos los trabajadores incansables de la ciencia que se han tomado su tiempo para responder a mis preguntas. Ni, por supuesto, a Pablo Hernández, un gran dibujante y autor de la portada de este trabajo. ¡Por el compañerismo y la colaboración en el trabajo recibidos, muchas gracias!

También quiero dar las gracias a mis familiares y especialmente a mis padres y hermano, porque siempre me han apoyado en este recorrido. Me han ayudado a relativizar los problemas y mantener la confianza en mí misma. Y gracias a ti también Jatxu, porque siempre me has ayudado en todo lo que has podido y porque siempre has intentado dibujar una sonrisa en mi cara.

A mis amigos también, por todo y de corazón, gracias. En diferentes momentos y de diferentes modos, pero todos me habéis ayudado mucho en este camino y siempre, para cualquier cosa, estáis ahí. Todos los momentos pasados con vosotros siempre me han ayudado a respirar y recuperar fuerzas. ¡Muchas gracias por lo tanto por todos esos momentos!

Mila esker guztioi! Guztiok zarete
doktorego tesi honen parte!

¡De corazón, muchas gracias a todos!
¡Sois parte de esta tesis doctoral!

ABREVIATURAS

3' UTR:	<i>3' untranslated region</i> o región 3' no traducida
5' UTR:	<i>5' untranslated region</i> o región 5' no traducida
AD:	<i>Asexual development</i> o desarrollo asexual
Af:	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AspGD:	<i>Aspergillus Genome Database</i>
BIFC:	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i> o Complementación de Fluorescencia Bimolecular
bZip:	<i>Basic zipper</i> o dominio de cremallera de leucina
cDNA:	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> o ácido desoxirribonucleico complementario
CDP:	<i>Central developmental pathway</i> o ruta central del desarrollo
Chr:	<i>Chromosome</i> o cromosoma
CHIP:	<i>Chromatin immunoprecipitation</i> o inmunoprecipitación de cromatina
CT:	<i>Cycle threshold</i>
dba:	<i>Derivative of benzaldehyde</i> o derivado del benzaldehído
DBD:	<i>DNA binding domain</i> o dominio de unión a DNA
DEPC:	<i>Diethylpyrocarbonate</i> o dietilpirocarbonato
DIG:	Digoxigenina
DIM:	<i>Dimerization domain</i> o dominio de dimerización
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i> o ácido desoxirribonucleico
DNAsa:	<i>Deoxyribonuclease</i> o desoxirribonucleasa
DTT:	<i>1,4-dithiothreitol</i> o 1,4-ditiotreitól
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> o ácido etilendiaminotetraacético
EMSA:	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> o ensayo de movilidad electroforética (retardo en gel)
FC:	<i>Fold change</i>
FDR:	<i>False-discovery-rate</i>
Fib:	<i>Fluffy low bristle expression</i> o aconidial con baja expresión de <i>brlA</i>
FOA:	<i>Fluoroorotic acid</i> o ácido 5-fluororótico
FPKM:	<i>Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped</i> o fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados
FT:	Factor transcripcional
gDNA:	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i> o ácido desoxirribonucleico genómico
GFP:	<i>Green fluorescence protein</i> o proteína fluorescente verde de la medusa <i>Aquorea victoria</i>
GO:	<i>Gene ontology</i> u ontología génica
GST:	<i>Glutathione S-transferase</i> o glutatión S-transferasa
HA:	<i>Hemagglutinin</i> o residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
HEPES:	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGT:	<i>Horizontal gene transfer</i> o transferencia horizontal de genes
HPH:	<i>Hydrophobin</i> o hidrofobina
IPTG:	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> o isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa:	Kilodalton (=1000Da)
LB:	<i>Luria-Bertani</i>
MCA:	Medio completo <i>Aspergillus</i>
mCh:	<i>CherryRed Fluorescent Protein</i> o proteína roja fluorescente <i>CherryRed</i>
MFA:	<i>Aspergillus fermentation medium</i> o medio de fermentación

MFS:	<i>Major facilitator superfamily</i> o superfamilia de transportadores facilitadores principales
min:	Minutos
MMA:	Medio mínimo <i>Aspergillus</i>
MMR:	Medio mínimo de regeneración
MMR-TOP:	Medio mínimo de regeneración - TOP
MOPS:	<i>3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid</i> o ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
mRFP:	<i>Monomeric red fluorescent protein</i> o proteína monomérica fluorescente roja del coral <i>Discosoma striata</i>
mRNA:	<i>Messenger ribonucleic acid</i> o ácido ribonucleico mensajero
MS:	<i>Secondary metabolite</i> o metabolito secundario
MT:	Microtúbulo
NLS:	<i>Nuclear localization signal</i> o señal de localización nuclear
NRPS:	<i>Nonribosomal peptide synthetase</i> o sintetasa de péptido no ribosomal
nt:	Nucleótido
NTC:	<i>No template control</i>
ORF:	<i>Open reading frame</i> o marco abierto de lectura
pb:	Pares de bases
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i> o tampón fosfato salino
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
PE:	Perfil de expresión
PEG:	Polietilenglicol
PKS:	<i>Polyketide synthase</i> o policétido sintasa
qPCR:	<i>Quantitative PCR</i> o PCR cuantitativa
rpm:	<i>Revolutions per minute</i> o revoluciones por minuto
rRNA:	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> o ácido ribonucleico ribosómico
RNA:	<i>Ribonucleic acid</i> o ácido ribonucleico
RNAsa:	Ribonucleasa
RNA-seq:	<i>RNA sequencing</i> o secuenciación masiva de RNA
ROS:	<i>Reactive oxygen species</i> o especies reactivas de oxígeno
RPKM:	<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i> o lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas
RT:	Retrotranscriptasa
RT-PCR:	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> o dodecil sulfato de sodio
sem:	<i>Standard error of the mean</i> o error estándar de la media
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphism</i> o polimorfismo de nucleótido único
Spk:	<i>Spitzenkörper</i>
TCA:	<i>Trichloroacetic acid</i> o ácido tricloroacético
Tris:	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> o tris (hidroximetil)-aminometano
UDA:	<i>Upstream developmental activators</i> o activadores de la regulación temprana
uORF:	<i>Upstream ORF</i>
UV:	Ultravioleta
VG:	<i>Vegetative growth</i> o crecimiento vegetativo
WMM:	<i>Watch minimal medium</i>
YFP:	<i>Yellow fluorescent protein</i> o proteína fluorescente amarilla
Oligonucleótidos:	
PP1:	<i>Promoter primer 1</i>

PP2: *Promoter primer 2*
SMP1: *Selectable marker primer 1*
GFP1: *Green fluorescence primer 1*
GFP2: *Green fluorescence primer 2*
GSP1: *Gene specific primer 1*
GSP2: *Gene specific primer 2*
GSP3: *Gene specific primer 3*
GSP4: *Gene specific primer 4*

Índice.

Introducción.

1.- El hongo filamentoso <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio del desarrollo.....	3
2.- Ciclo de vida de <i>A. nidulans</i>	4
2.1. Fases del ciclo de vida.....	4
2.2. Desarrollo y metabolitos secundarios.....	8
3.- Crecimiento apical y comunicación punta-núcleo en hifas vegetativas.....	9
3.1. Polarización y extensión apical de las hifas vegetativas.....	9
3.2. Función de señalización de la punta en hifas vegetativas.....	12
4.- Control genético y molecular del desarrollo asexual.....	13
4.1. Estímulos inductores de la conidiación.....	13
4.2. Desarrollo del conidióforo.....	16
4.3. Control genético de la conidiación.....	17
4.3.1. Ruta central de la conidiación.....	18
4.3.2. Ruta de Inducción temprana.....	19

Objetivos.

Objetivos:.....	27
-----------------	----

Materiales y métodos.

1.- Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados.....	31
1.1. Cepas de <i>A. nidulans</i>	31
1.2. Oligonucleótidos.....	33
1.3. Plásmidos.....	39
1.3.1. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	39
1.3.2. Plásmidos utilizados en <i>A. nidulans</i>	40
1.3.3. Plásmidos utilizados en secuenciaciones de DNA.....	41
2.- Condiciones y medios de cultivo para <i>A. nidulans</i>	42

3.- Recuento de conidios y cleistotecios.....	45
4.- Transformación de protoplastos de <i>A. nidulans</i>	46
5.- Aislamiento y manipulación de ácidos nudeicos.....	48
5.1. Construcción de mutantes nulos y etiquetado de genes de <i>A. nidulans</i>	48
5.2. Mutagénesis dirigida de FlbB.....	49
5.3. Extracción de DNA genómico de <i>A. nidulans</i>	52
5.4. Extracción de RNA total de <i>A. nidulans</i> para experimentos de <i>Northern-blot</i>	53
5.5. Experimentos de <i>Southern-blot</i>	54
5.6. Experimentos de <i>Northern-blot</i>	56
5.7. RT-qPCR.....	57
6.- Técnicas de biología molecular para <i>E. coli</i>	58
6.1. Condiciones y medio de cultivo.....	58
6.2. Transformación de <i>E. coli</i>	58
6.3. Extracción de DNA plasmídico.....	59
6.4. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	59
7.- Aislamiento y manipulación de proteínas de <i>A. nidulans</i>	60
7.1. Extracción de proteína total.....	60
7.2. Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de <i>Western-blot</i>	61
8.- Ensayos de retención de proteínas mediante la técnica de <i>pull-down</i>	62
9.- Co-cultivos de <i>A. nidulans</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	63
10.- Análisis de la localización subcelular de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.	64
11.- Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias genómicas y proteicas: alineamientos y conservación.....	66
12.- Secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).....	66
12.1. Aislamiento de RNA, construcción de la librería de mRNA, y secuenciación Illumina...	67

12.2. Demultiplexado, mapeo respecto al genoma de referencia y cuantificación de los datos de secuenciación.....	67
12.3. Análisis de Ontología génica (GO).....	68

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

1.- Introducción.....	71
2.- Genes significativamente desregulados en ausencia de actividad FlbB.	73
2.1. FlbB y su posible función como activador transcripcional.....	73
2.2. Los términos de ontología génica (GO) y el perfil de expresión de los genes desregulados significativamente permiten la identificación de procesos celulares alterados en ausencia de <i>flbB</i>	76
2.3. Análisis de los genes Top20: funciones celulares cuantitativamente más desreguladas en ausencia de FlbB.....	79
3.- Resultados del RNA-seq correspondientes a procesos biológicos específicos.....	83
3.1. La ausencia de <i>flbB</i> y la expresión de genes del metabolismo secundario.	83
3.2. La ausencia de actividad FlbB deriva en la inhibición de genes implicados en el desarrollo asexual.....	86
3.3. Análisis de una posible regulación positiva ejercida por FlbB sobre su propia transcripción.....	89
4.- Discusión.....	92

Desregulación del metabolismo secundario y el desarrollo sexual en ausencia de actividad de FlbB.

1.- Introducción.....	99
2.- Caracterización de los <i>cluster</i> génicos <i>An2030-2038</i> y <i>dba</i>	99
2.1. Estudio del <i>cluster An2030-2038</i>	99

2.2. La inducción de la expresión del <i>cluster</i> metabólico <i>dba</i> aumenta la viabilidad de <i>A. nidulans</i> ante la bacteria <i>M. luteus</i> .	102
2.2.1. Conservación del <i>cluster dba</i> .	102
2.2.2. Confirmación de la inducción del <i>cluster dba</i> en un fondo genético nulo en <i>flbB</i> .	104
2.2.3. Estudio fenotípico de los mutantes nulos en los genes <i>dba</i> .	105
2.2.4. La viabilidad de <i>A. nidulans</i> ante la bacteria <i>M. luteus</i> aumenta como consecuencia de la expresión del <i>cluster dba</i> .	107
3.- <i>flbB</i> es necesario para la correcta expresión de <i>An4394</i> , el cual codifica un supuesto FT de tipo bHLH que inhibe el desarrollo sexual.	110
3.1. <i>An4394</i> es un regulador temprano del desarrollo asexual.	110
3.2. La expresión del gen <i>An4394</i> se reprime en los mutantes UDA.	112
3.3. <i>An4394</i> es un regulador de los ciclos de desarrollo asexual y sexual.	113
3.4. La expresión de <i>nsdD</i> en el mutante nulo de <i>urdA</i> no varía significativamente.	116
4.- Discusión.	117

Estudio de la función de FlbD en la acumulación de FlbB en el núcleo.

1.- Introducción.	123
2.- Una señal de localización nuclear bipartita situada en el extremo N-terminal participa en la acumulación de FlbB en el núcleo.	123
3.- La delección de <i>flbD</i> modifica la localización subcelular de FlbB y permite el estudio de su movilidad en el citoplasma.	127
4.- El aumento de la expresión de <i>flbD</i> induce el desarrollo asexual y modifica la localización nuclear de FlbB.	130
4.1. La sobreexpresión de <i>flbD</i> induce la conidiación.	130
4.2. Análisis en medio sólido.	130
4.3. Efecto de la sobreexpresión de <i>flbD</i> sobre la localización nuclear de FlbB.	133
5.- Análisis preliminar de los dominios de FlbB necesarios en su posible interacción con FlbD.	136
6.- Discusión.	139

Discusión general.

Discusión general.	145
-------------------------	-----

Conclusiones.

Conclusiones:.....	161
--------------------	-----

Bibliografía.

Bibliografía:.....	165
--------------------	-----

Anexos.

ANEXO 1. RNA-seq. Análisis de la reproducibilidad de las muestras.	185
ANEXO 2:	187
ANEXO 3:	188
ANEXO 4:	189
ANEXO 5:	190
ANEXO 6:	191
ANEXO 7:	192
ANEXO 8:	193

Introducción.

1.- El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio del desarrollo.

El crecimiento y desarrollo de los hongos filamentosos conlleva la adquisición de morfologías y funciones especializadas. El tipo celular que define a este grupo de organismos es la hifa vegetativa. Esta estructura tubular se extiende rápidamente sobre diversos sustratos permitiendo su colonización, a la vez que realiza la detección de estímulos de naturaleza variada. La transducción de estímulos específicos induce una reprogramación genética que, en determinados casos, deriva en la diferenciación celular y la generación de estructuras reproductivas (Casselton y Zolan, 2002). Conocer los genes y los mecanismos moleculares que regulan esa diferenciación celular es de interés para diversos campos como la medicina o la agricultura (Fisher *et al.*, 2012) y para ello, uno de los modelos más utilizados y mejor caracterizados ha sido el hongo *Aspergillus nidulans* (Martinelli y Kinghorn, 1994).

Este Ascomiceto pertenece a la clase de los Eurotiomicetos y a la orden Eurotiales (Geiser *et al.*, 2006). Su genoma consta de 30.48 millones de pares de bases organizados en 8 cromosomas y 10 687 genes (el número de genes es el predicho por la base de datos *Aspergillus Genome Database*, www.aspgd.org). Hasta ahora, la secuencia de su genoma se encontraba disponible en la AspGD pero dichos datos y su actualización han quedado a cargo de la base de datos *Fungal and Oomycete Genomics Resources* (<http://fungidb.org/fungidb/>).

Son varias las características que han convertido a *A. nidulans* en un hongo filamentoso modelo ampliamente estudiado. Es una especie próxima evolutivamente a otras de gran impacto económico como *A. oryzae*, *A. fumigatus* o *A. flavus*. Es capaz de formar esporas sexuales mediante meiosis y su naturaleza homotálica permite el cruce sexual de dos cepas con igual o diferente dotación genética (Paoletti *et al.*, 2007). Además, existen, múltiples técnicas de biología molecular y celular adaptadas y aplicadas de forma rutinaria a este

organismo. Técnicas de secuenciación masiva como el RNA-seq también han sido introducidas en el estudio del crecimiento, diferenciación y respuesta a diferentes estímulos de *A. nidulans* (ver, por ejemplo, (Alkahyyat *et al.*, 2015; Garzia *et al.*, 2013)). Esta técnica ofrece la posibilidad de realizar un análisis cuantitativo de todos los transcritos producidos por una cepa o tipo celular en un momento y condiciones determinadas, permitiendo un análisis detallado del transcriptoma y la comparación de los patrones de expresión entre diferentes muestras. Así, el RNA-seq, no sólo permite cuantificar la cantidad de un transcrito, también permite detectar, por ejemplo, fenómenos de splicing alternativo o SNP (de las siglas en inglés: single nucleotide polymorphism), la presencia de intrones y exones o el inicio y final de un transcrito (Shendure, 2008). Además, presenta mayor sensibilidad y reproducibilidad, y un rango dinámico más amplio que otras técnicas de análisis transcriptómico como los microarray, permitiendo un análisis más preciso de la expresión y la regulación génica (Wang *et al.*, 2009).

2.- Ciclo de vida de *A. nidulans*.

2.1. Fases del ciclo de vida.

El ciclo de vida de *A. nidulans* se divide en cuatro fases: crecimiento vegetativo, ciclo asexual, ciclo sexual y ciclo parasexual (Figura 1.1) (Todd *et al.*, 2007b). La fase de crecimiento vegetativo (fase invasiva) se inicia a partir de una espora haploide, que puede ser una conidiospora mononucleada o una ascospora binucleada. Después de una fase de expansión isotrópica (extensión en todas las direcciones), se establece un punto de polaridad en la espora (Figura 1.1A) (Momany, 2002). Los criterios en base a los cuales es seleccionado un punto determinado para el establecimiento de la polaridad son desconocidos aún pero, es en este punto donde emerge el tubo de germinación. La geminación requiere del transporte al punto de polaridad de los materiales y maquinaria molecular para la fabricación de la membrana plasmática y también la pared celular (Harris y Momany, 2004).

La extensión apical (por la punta) del tubo de germinación genera una estructura tubular, haploide y sincitial denominada hifa vegetativa (ver sección 3.1), la cual, está compartimentalizada a través de la formación de septos, tabiques porosos que permiten un intercambio selectivo de nutrientes y otros compuestos entre dichos compartimentos ((Harris, 2001) y referencial allí citadas). Las hifas también generan ramificaciones, nuevos puntos de polaridad que pueden fusionarse mediante un proceso denominado anastomosis y formar un entramado de filamentos denominado micelio, el cual, se expande radialmente generando una colonia (Glass *et al.*, 2004). Dentro de la colonia, las hifas periféricas presentan pocas ramificaciones y éstas evitan el contacto entre ellas (Hickey *et al.*, 2002). De esta manera se promueve el crecimiento radial de la colonia y se aumenta la velocidad a la que el sustrato es colonizado. Por detrás de la zona periférica, sin embargo, se establece gradualmente un patrón opuesto de crecimiento, con un aumento de la frecuencia de ramificación y la fusión entre las hifas.

Es en las regiones interiores del micelio donde se induce el desarrollo asexual tras la detección de determinados estímulos (ver sección 4.1). Las primeras evidencias fenotípicas del inicio del desarrollo asexual son observables aproximadamente 16 horas después de la germinación, siendo necesarias alrededor de ocho horas adicionales para culminar la formación del conidióforo (Figura 1.1B) ((Adams *et al.*, 1998); ver sección 4.2 de esta Introducción). La dispersión de las esporas asexuales a nuevos nichos da comienzo a nuevos ciclos de crecimiento vegetativo y, por tanto, de colonización.

La reproducción asexual precede al ciclo sexual. Se conocen numerosos reguladores del ciclo sexual, cuyo objetivo es la formación de esporas meióticas denominadas ascosporas (Figura 1.1B) (Dyer y O'Gorman, 2012). El proceso comienza con la fusión (anastomosis) de dos hifas homocarióticas, hifas en las que todos los núcleos contienen el mismo material genético, y la generación de una hifa heterocariótica, donde conviven en un mismo citoplasma núcleos

con dotación genética diferente. Dos núcleos de la hifa heterocarionte se fusionan en una estructura llamada *crozier*, dando lugar a un núcleo diploide transitorio. A continuación, el núcleo diploide se divide primero por meiosis y después por mitosis para dar lugar, finalmente, a 8 ascosporas contenidas en una estructura denominada asca (Todd *et al.*, 2007b). El cuerpo fructífero donde se encuentra el conjunto de ascas se denomina cleistotecio y se encuentra habitualmente rodeado de grupos de células llamadas células Hülle, las cuales, podrían proporcionar azúcares y otros nutrientes al cleistotecio (Figura 1.1B) (Dyer y O'Gorman, 2012). Cada cleistotecio contiene cientos de ascas, cada una con ocho ascosporas binucleadas y haploides. Por lo tanto, el número de ascosporas contenido en cada cleistotecio puede llegar a superar las 10 000 (Todd *et al.*, 2007b).

La formación del heterocarionte por anastomosis de hifas homocarióticas es la base del ciclo parasexual (Figura 1.1B). Tal y como ocurre en el *crozier*, los núcleos haploides del heterocarionte se fusionan (cariogamia) y dan lugar a estirpes diploides (Glass *et al.*, 2000). Una pérdida aleatoria de cromosomas causaría la haploidización y el restablecimiento de una dotación cromosómica haploide (Todd *et al.*, 2007a).

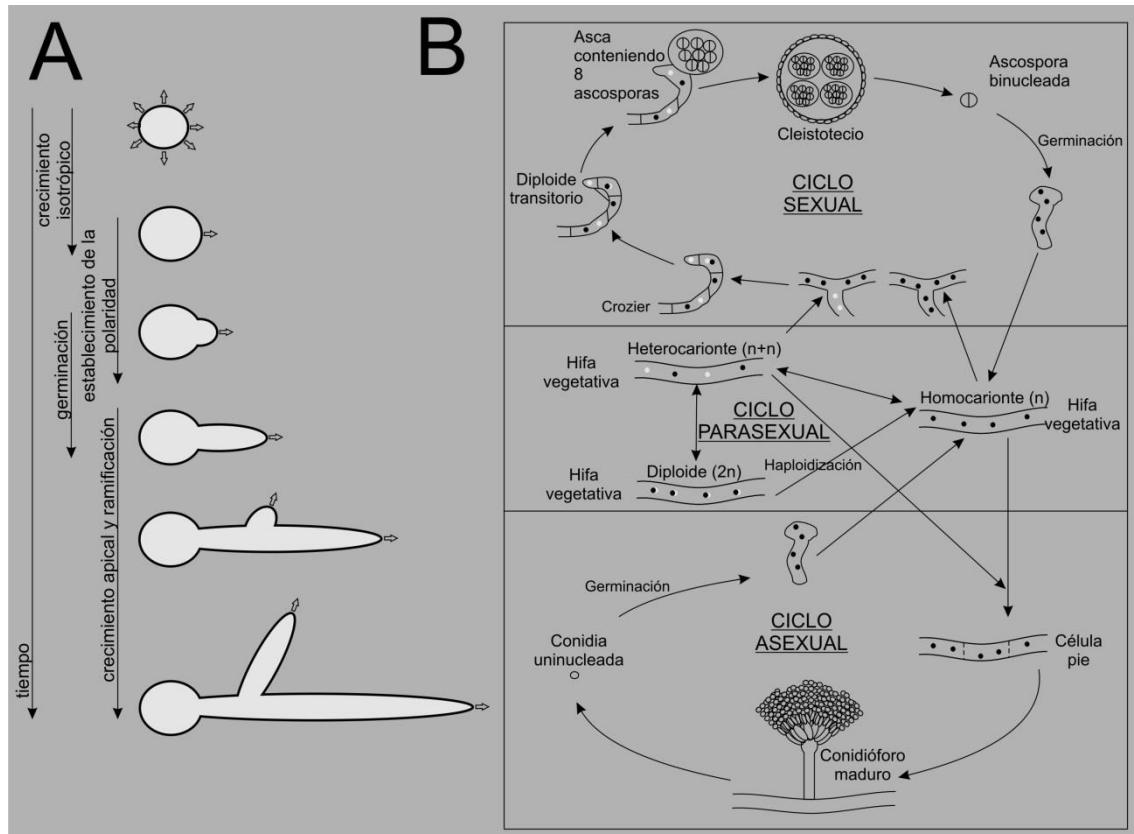


Figura 1.1. Ciclo de vida de *A. nidulans*. A) Morfogénesis de la hifa vegetativa. Tras una etapa inicial de crecimiento isotrópico, se selecciona un punto de polaridad dentro de una espora (conidiospora mononucleada o una ascospora binucleada). En este punto emerge el tubo de germinación, que crece por la adición en el ápice de los materiales que forman la membrana plasmática y la pared celular. Posteriormente, las ramificaciones originan nuevos puntos de crecimiento polar, permitiendo la extensión de las hifas en diferentes direcciones. B) Ciclo de vida de *A. nidulans*. Se divide en cuatro fases: crecimiento vegetativo (detallado en el panel A), ciclo asexual, ciclo sexual y ciclo parasexual. El ciclo asexual deriva en la generación de conidióforos, estructuras que portan miles de conidios o esporas asexuales. El ciclo sexual comienza con la fusión de dos hifas homocarióticas (anastomosis) y la generación de una hifa heterocariote. La fusión de dos núcleos en una estructura llamada *crozier* genera un núcleo diploide transitorio que a continuación se divide por meiosis primero y mitosis después. El proceso culmina con la producción de ascosporas, esporas binucleadas y haploides contenidas en sacos denominados ascas. Cada asca contiene 8 ascosporas. Finalmente, en el ciclo parasexual se genera un heterocariote por fusión de dos hifas. La cariogamia o fusión de núcleos dentro del heterocariote da lugar al diploide ($2n$). Posteriormente se puede dar un proceso de haploidización donde la pérdida de cromosomas es, en principio, aleatoria. Así, se puede llegar a alcanzar una variabilidad genética comparable a la de los descendientes de un proceso de división meiótica (sexual), y terminar con la generación de núcleos haploides. Modificado a partir de (Momany, 2002; Todd *et al.*, 2007b).

2.2. Desarrollo y metabolitos secundarios.

La formación de las estructuras reproductivas se basa en complejos mecanismos de regulación y es destacable la relación que estos mecanismos mantienen con la producción de metabolitos secundarios (MMSS) (Fox y Howlett, 2008). Los MMSS son moléculas de bajo peso molecular y estructuralmente heterogéneas que, a diferencia de los metabolitos primarios, no son directamente necesarias para garantizar el crecimiento de los organismos que los producen (Brakhage, 2013). Las enzimas necesarias para la síntesis de MMSS están codificadas en el genoma y una particularidad de estos genes es que están habitualmente localizados en agrupaciones o *cluster-s* de genes (ver anotaciones para *cluster* de MMSS en diferentes especies de *Aspergillus* en (Inglis *et al.*, 2013)). Estas agrupaciones se caracterizan por la presencia de al menos un gen que codifica una policétido sintasa (PKS, de sus siglas en inglés, *polyketide synthase*) (Cox, 2007) o sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS, de sus siglas en inglés, *nonribosomal peptide-synthetase*) (von Dohren H., 2009).

Los MMSS pueden clasificarse en tres categorías en función de la relación que tienen con el desarrollo: 1) los metabolitos que promueven la inducción o represión de procesos de desarrollo (por ejemplo, compuestos derivados del ácido linoleico; ver sección 4.1), 2) los pigmentos requeridos para las estructuras esporogénicas (por ejemplo, las melaninas, requeridas para la formación y la integridad tanto de esporas asexuales como sexuales), y 3) los metabolitos tóxicos o micotoxinas secretados durante el proceso de esporulación (Calvo *et al.*, 2002). Varios estudios han propuesto que las micotoxinas sirven como un arsenal molecular que ayuda al hongo competir con otros organismos presentes en su entorno natural (Alkhayyat y Yu, 2014). Uno de los ejemplos más conocidos en *A. nidulans* y hongos filamentosos de micotoxina cuya síntesis está asociada al desarrollo es el de la esterigmatocistina. Ha sido comprobado que la actividad de diversos reguladores del desarrollo controla la producción de este metabolito (ver referencias en (Calvo y Cary, 2015)). La activación del *cluster* de la esterigmatocistina está regulada por *LaeA*, una supuesta

metiltransferasa que está considerada como regulador maestro del metabolismo secundario. LaeA es, a su vez, parte del complejo velvet que participa en el balance entre ciclos asexual y sexual (ver sección 4.1), uniendo de esta manera el control del desarrollo y la síntesis de micotoxinas. También ha sido descrito que cepas aconidiales como el mutante nulo en *fluG* (ver sección 4.3.2) presentan alteraciones en la biosíntesis de esterigmatocistina (Hicks *et al.*, 1997).

3.- Crecimiento apical y comunicación punta-núcleo en hifas vegetativas.

La extensión apical de las hifas vegetativas constituye el mecanismo principal para la colonización de un sustrato por parte de los hongos filamentosos. Este mecanismo de crecimiento requiere la acumulación asimétrica de los componentes de la pared celular y la membrana plasmática en la punta, así como de la maquinaria encargada de su transporte, síntesis y ensamblaje. Las hifas vegetativas, por otro lado, son reprogramadas en respuesta a diferentes estímulos y ha sido descrito que algunas de las rutas de transducción correspondientes comunican la punta de las hifas con la regulación transcripcional en los núcleos (Etxebeste y Espeso, 2016).

3.1. Polarización y extensión apical de las hifas vegetativas.

El crecimiento apical de las hifas vegetativas implica la coordinación de los citoesqueletos de actina y tubulina, sus respectivos motores moleculares y la formación, tráfico y fusión de vesículas de transporte que contienen los cargos correspondientes (Figura 1.2) (Bartnicki-Garcia, 2002; Riquelme, 2013). El tráfico de vesículas puede ocurrir en dos direcciones. Por una parte, el transporte acropetal dirige las vesículas secretoras o de exocitosis hacia el ápice. La exocitosis es la última etapa de la ruta secretora, y por lo tanto proporciona cargos específicos al sitio de crecimiento (Riquelme, 2013). Por otra parte,

endocitosis es el proceso opuesto a la exocitosis y se basa en la internalización de la membrana. En hifas vegetativas este proceso ocurre masivamente en el subápice (en morado en la Figura 1.2) (Araujo-Bazan *et al.*, 2008b). Existe un equilibrio entre ambos procesos, de modo que la exocitosis, mayoritaria en el ápice de la punta, y la endocitosis, predominante en el subápice, se acoplan para sostener el crecimiento polar (Figura 1.2) (Schultzhaus y Shaw, 2015).

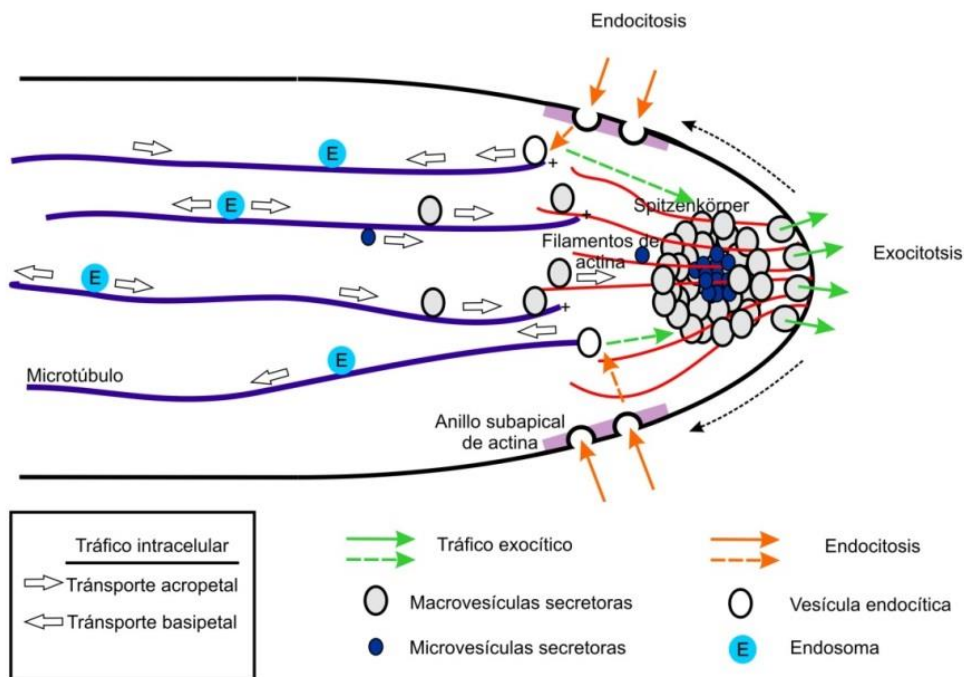


Figura 1.2. Representación de la región apical en hifas vegetativas de *A. nidulans*. Se indican la dirección del transporte acropetal y basipetal, así como las zonas donde la exocitosis y endocitosis son mayoritarias. El transporte acropetal dirige las vesículas secretoras (se ha propuesto que hay vesículas de diferente tamaño, denominadas macro- y microvesículas, respectivamente) hacia el ápice a través de los filamentos de tubulina y actina. El transporte basipetal dirige las vesículas endocíticas hacia zonas distales de la hifa para su procesamiento y la reutilización de componentes específicos. Este proceso se da a través de los endosomas, que pueden desplazarse bidireccionalmente. Algunas de las proteínas endocitadas en el subápice, sin embargo (representado en color morado y flechas naranjas), son reincorporadas a la ruta secretora, como se indica a través de las flechas verdes discontinuas. Manteniendo un equilibrio entre los procesos de endocitosis y exocitosis, el tráfico intracelular permite una elevada velocidad de crecimiento. Modificado a partir de los modelos publicados por (Riquelme, 2013;Schultzhaus y Shaw, 2015;Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

El citoesqueleto de actina es esencial para el mantenimiento del crecimiento polarizado en las hifas vegetativas. Es precisamente en los filamentos de actina donde tiene lugar el transporte acropetal de cargos entre subápice y ápice mediante los motores moleculares correspondientes o miosinas (Berepiki *et al.*, 2011). Por otro lado, los microtúbulos (MMTT), filamentos tubulares que se componen de heterodímeros de tubulina α y β , permiten un transporte bidireccional a lo largo de la hifa vegetativa. En la interfase y, aunque en menor medida también en mitosis, los MMTT generan largos filamentos que orientan sus extremos plus (extremo de ensamblaje, o crecimiento, y desensamblaje, o catástrofe) hacia el ápice (Konzack *et al.*, 2005; Zekert y Fischer, 2009). Los MMTT son utilizados por los motores moleculares para el transporte a larga distancia de orgánulos, vesículas, complejos de RNA y proteínas membranosas (Figura 1.2) (Egan *et al.*, 2012; Jansen *et al.*, 2014). Se diferencian dos tipos de motores moleculares. Las quinesinas se desplazan hacia el extremo plus de los MMTT, lo cual coincide con el transporte acropetal, mientras que la dineína transita hacia el extremo minus (transporte basipetal) (Steinberg, 2007; Xiang *et al.*, 2015).

Así, los cargos procesados en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi son transportados a lo largo de los MMTT por quinesinas hasta que serían transferidos a los filamentos de actina (Takeshita *et al.*, 2014). Intercalado entre los filamentos de actina en el ápice, el *Spitzenkörper* (Spk) o cuerpo apical actuaría como centro suministrador de vesículas exocíticas (Figura 1.2), sincronizando el flujo de éstas hacia la membrana apical y su fusión con esta, paso final del proceso de exocitosis que estaría controlado por el complejo exocisto (Schultzhaus y Shaw, 2015).

En el sentido contrario, los componentes de la membrana plasmática y la pared celular se incorporan a vesículas endocíticas para su reciclaje. La mayoría del material endocitado se incorpora a los endosomas, compartimientos membranosos que transportan los cargos hacia

zonas distales hasta su fusión con las vacuolas (Abenza *et al.*, 2009; Abenza *et al.*, 2012; Penalva, 2010). Algunos de los materiales endocitados, sin embargo, se incorporan de nuevo a la vía de exocitosis, acoplando así la exocitosis y la endocitosis, y manteniendo la tasa de exocitosis requerida para sostener la rápida extensión de las hifas (Penalva, 2010).

3.2. Función de señalización de la punta en hifas vegetativas.

Debido al crecimiento polarizado, la punta es la primera región de las hifas vegetativas en establecer contacto con la superficie que será posteriormente colonizada. Por ello, se propuso que la punta de las hifas podría jugar un papel importante en la prospección del nuevo entorno y la evaluación de las condiciones de crecimiento (Harris, 2009). Esta hipotética función sensora, por otro lado, requeriría la transducción de las señales recibidas al núcleo, donde se ejecutaría la respuesta de adaptación (Etxebeste y Espeso, 2016).

En los últimos años se ha descrito la existencia de al menos cuatro mecanismos de este tipo en hifas vegetativas. Uno de ellos relaciona la actividad de determinadas quinasas que regulan la síntesis de efectores (moléculas secretadas por hongos patógenos, las cuales, modulan la interacción entre el hongo y el hospedador; (Lo *et al.*, 2015)) con la dinámica basipetal de los endosomas en el patógeno del maíz *Ustilago maydis* (Bielska *et al.*, 2014). Los tres ejemplos restantes han sido descritos en *A. nidulans*. El primer caso corresponde a la respuesta a determinadas condiciones de estrés salino, en la cual, dos proteínas denominadas Calmodulina y Calcineurina, respectivamente, transmitirían las señales recibidas en la punta al FT CrzA, siendo éste importado del citoplasma al núcleo para regular los genes diana (Hernandez-Ortiz y Espeso, aceptado). El segundo ejemplo corresponde a un módulo señalizador, el cual, regula el metabolismo secundario y el desarrollo sexual (Bayram *et al.*, 2012). Las quinasas Ste7/MkkB, Ste11/SteC y Fus3/MpkB, y el adaptador Ste50/SteD, el cual permite la unión del módulo a la membrana, forman un complejo localizado en la punta de las hifas y que migra a la periferia nuclear. De ellos, Fus3/MpkB es capaz de acumularse en el

núcleo, donde controla la actividad transcripcional de VeA, un FT dependiente de la luz que equilibra los ciclos de desarrollo sexual y asexual así como el metabolismo secundario (ver apartado 4.1) (Calvo y Cary, 2015), y Ste12/SteA, un FT esencial para la reproducción sexual (Vallim *et al.*, 2000). El tercer y último caso conocido hasta ahora en *A. nidulans* corresponde a la ruta de transducción que se ha estudiado en esta tesis doctoral, la cual, controla el desarrollo asexual. Por ello, la información disponible será ampliada en la sección 4.3.2 de esta Introducción.

4.- Control genético y molecular del desarrollo asexual.

4.1. Estímulos inductores de la conidiación.

La exposición del micelio al aire es el principal desencadenante de los cambios morfológicos que derivan en la formación del conidióforo en *A. nidulans* (Morton, 1961). En base a las evidencias obtenidas en diferentes trabajos, se ha propuesto que la inducción de la conidiación en estas condiciones es consecuencia de la acumulación en la superficie de las hifas de un metabolito de carácter endógeno o autorregulador (Roncal y Ugalde, 2003; Ugalde, 2006). Así, la actividad de la proteína FluG (ver sección 4.3.2) está ligada a la síntesis del meroterpenoide deshidroaustinol (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012), molécula cuyo papel en la inducción de la conidiación sería equivalente al de la conidiogona en *Penicillium cyclopium* (Roncal *et al.*, 2002). La síntesis del deshidroaustinol está regulada por un *cluster* del metabolismo secundario (Lo *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2011). El deshidroaustinol participa en la inducción de la conidiación a través de la formación de un aducto con un segundo compuesto denominado diorcinol, el cual impide la formación de cristales de deshidroaustinol y, por lo tanto, permitiría la acumulación y función de señalización en la superficie de las hifas aéreas (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). Estos dos metabolitos no serían los únicos necesarios para inducir el desarrollo asexual, ya que, se ha propuesto la existencia de al menos un tercer

compuesto cuya síntesis ha sido relacionada con los productos de los genes *flb* (ver sección 4.3.2) ((Etxebeste *et al.*, 2008) y referencias allí citadas). Sin embargo, se desconoce la naturaleza de este metabolito.

Otras moléculas denominadas oxilipinas, familia de MMSS que se sintetizan a partir de los ácidos grasos poliinsaturados, actúan como señales autorreguladoras en el desarrollo del hongo (Tsitsigiannis y Keller, 2007). Los factores *psiA*, *psiB* y *psiC*, los cuales son sintetizados por los productos de los genes *ppoA*, *ppoB* y *ppoC*, ejercen una función moduladora de los ciclos de desarrollo sexual y asexual (Tsitsigiannis *et al.*, 2005), primando uno de los dos ciclos frente al otro. Oxilipinas adicionales también ejercen un efecto importante sobre la inducción de la conidiación. Entre ellas, la 3-octanona es la principal inductora, y su síntesis parece aumentar al emerger el micelio al aire (Herrero-García *et al.*, 2011).

Estímulos adicionales, además del aire, son capaces de promover la conidiación en *A. nidulans*. Uno de ellos es la luz. La proteína VeA actúa como regulador central de la transducción de dicha señal, ya que, integra tanto la señal de luz roja (Mooney y Yager, 1990) como la de luz azul (Purschwitz *et al.*, 2008). VeA es capaz de variar rápidamente su localización subcelular y formar diferentes complejos proteicos, combinando así diferentes funciones sensoriales y reguladoras (Calvo *et al.*, 2016). Respecto a su localización, VeA se sitúa mayoritariamente en los núcleos de las hifas vegetativas cuando estas se encuentran en oscuridad (Stinnett *et al.*, 2007). Sin embargo, su transporte al núcleo se ve impedido por la iluminación y, en presencia de luz, VeA se distribuye tanto en el nucleoplasma como en el citoplasma (Stinnett *et al.*, 2007).

En el núcleo, VeA participa en dos complejos proteicos a través de los cuales regula el metabolismo secundario y los ciclos de desarrollo sexual y asexual (Calvo *et al.*, 2016). Por una parte, VeA interacciona con el fitocromo FphA, receptor de luz roja, el cual, a su vez interacciona con LreB-LreA, receptores de luz azul y ortólogos de los reguladores “White-

collar” de *N. crassa* (Corrochano, 2007;Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Se forma así un complejo proteico nuclear sensible a la luz (Bayram *et al.*, 2010). Actualmente se desconoce cómo actúa el complejo VeA-FphA-LreA-LreB a nivel molecular. Por otra parte, VeA interacciona con otros dos elementos, LaeA y VelB, formando en el núcleo un complejo denominado complejo velvet que es esencial en la coordinación del metabolismo secundario y el desarrollo (Bayram y Braus, 2012). En conjunto, la regulación dependiente de la luz ejercida por VeA deriva en que las cepas de *A. nidulans* con un alelo *veA* silvestre se desarrollen principalmente de forma asexual cuando las colonias se exponen a la luz, mientras que en la oscuridad el hongo desarrolla un mayor número de cleistotecios (Adams *et al.*, 1998). Sin embargo, las cepas con la mutación *veA1*, la cual causa que la proteína se encuentre predominantemente en el citoplasma independientemente de la presencia de iluminación (Stinnett *et al.*, 2007), desarrollan principalmente conidióforos y presentan una fase sexual retardada tanto en presencia de iluminación como en oscuridad (Kafer, 1965). Todas las cepas utilizadas en este trabajo contienen la mutación *veA1*, limitando así la dependencia del desarrollo asexual con respecto a la luz e induciendo la formación de conidióforos también en oscuridad.

Tanto el estrés salino como el agotamiento de nutrientes también inducen el desarrollo asexual en *A. nidulans* (Lee y Adams, 1996;Skromne *et al.*, 1995). El hambre de nitrógeno genera conidióforos en medio sumergido, lo cual no ocurre cuando el medio de crecimiento está adecuadamente suplementado (Skromne *et al.*, 1995). Por su lado, la falta de una fuente de carbono causa la producción de estructuras similares a fiálidas que generan cadenas cortas de conidios en la punta (Skromne *et al.*, 1995). La formación de conidióforos que incluyen todos los tipos celulares (ver siguiente sección) también es inducida al cultivar una cepa silvestre o determinados mutantes aconidiales en medio líquido o sólido que contiene concentraciones elevadas de sales de fosfato o sodio (Lee y Adams, 1996). La inducción en estas condiciones podría deberse a la activación de una ruta de señalización

alternativa (Virginia *et al.*, 2000) que transdujera dichas señales directamente a los reguladores del desarrollo del conidióforo descritos en el apartado 4.3.1. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido estudiada en detalle.

4.2. Desarrollo del conidióforo.

La generación del conidióforo implica la síntesis de diferentes tipos celulares, cada uno en un momento y posición determinados (Figura 1.3) (Mims *et al.*, 1988). Para ello, se combinan ciclos de crecimiento isotrópico y polarizado, así como procesos de gemación.

El desarrollo del conidióforo se inicia con la formación de la célula pie en un compartimento distal de la hifa vegetativa (Figura 1.3) (Adams *et al.*, 1998). A continuación, tal y como se describe en (Etxebeste *et al.*, 2010), el tallo emerge a partir de la célula pie y se extiende apicalmente. A ello le sigue una etapa de crecimiento isotrópico en la punta del tallo, la cual ocurre aproximadamente 6 horas después de la inducción y da lugar a una estructura globular llamada vesícula. La vesícula alberga múltiples divisiones nucleares y constituye la base para múltiples puntos de gemación de células llamadas métulas (Figura 1.3). Emergen aproximadamente 60 métulas mononucleadas (Etxebeste *et al.*, 2010).

La métula se extiende apicalmente por tiempo limitado y experimenta una división que da lugar a dos nuevas gemas apicales o fiálidas. Este proceso tiene lugar aproximadamente 10 horas después de la inducción del desarrollo del conidióforo (Figura 1.3). Cada fiálida produce, de forma basipetal, una cadena de hasta cien conidios, de modo que los conidios jóvenes están cerca de la fiálida mientras que los conidios maduros están situados en el extremo contrario de la cadena. Un conidióforo maduro es visible alrededor de 15 horas después de la inducción del desarrollo y puede albergar más de 10 000 conidios (Etxebeste *et al.*, 2010).

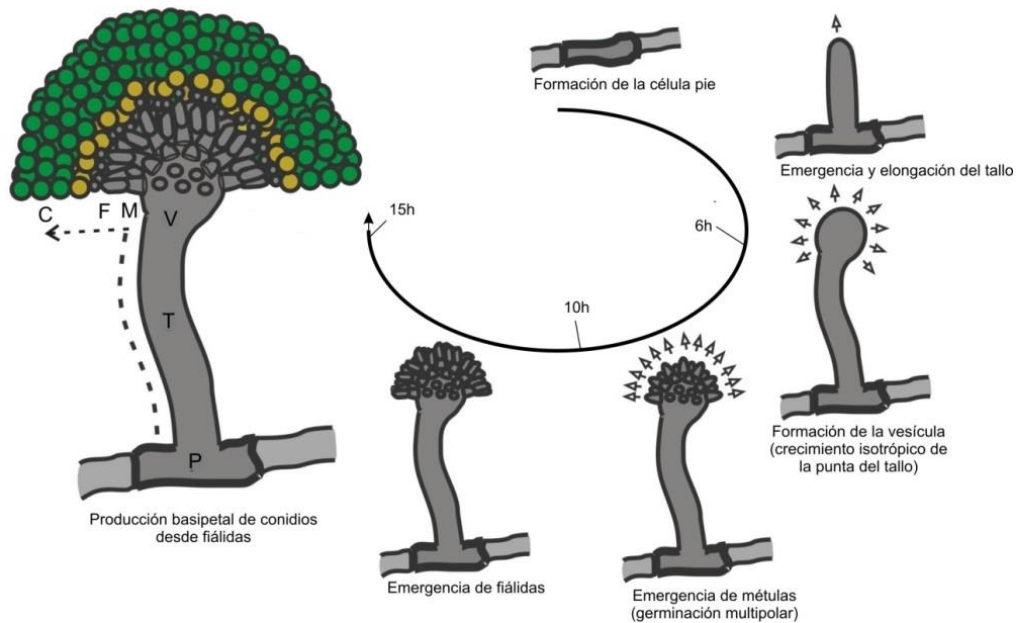


Figura 1.3. Producción de conidios en *A. nidulans*. Tras un cambio de las condiciones ambientales, el crecimiento polar se inhibe en determinadas hifas vegetativas y se genera la célula pie en una región distal (lejana a la punta). El tallo emerge de la célula pie y se extiende apicalmente hasta alcanzar una longitud definida. El crecimiento isotrópico de la punta del tallo genera la vesícula. Tras múltiples divisiones nucleares, los núcleos se acumulan en la zona superior de la vesícula, de la cual emergen aproximadamente 60 métulas mononucleadas. Después de una fase de extensión polar limitada de la métula, ésta se divide en dos fiálidas. Cada fiálida genera, de forma basipetal, cadenas largas de conidios. Modificado a partir de (Oartzabal-Arano *et al.*, 2016).

4.3. Control genético de la conidiación.

A nivel genético, el control de la reproducción asexual ha sido tradicionalmente dividido en dos rutas principales. La primera de ellas, o ruta de inducción temprana (UDA, del inglés: *upstream developmental activation pathway*), es la encargada de la transducción de señales ambientales y la inducción de la conidiación. La segunda de ellas, o ruta central de conidiación (CDP, del inglés: *central developmental pathway*), controla la mayoría de cambios morfológicos necesarios para la generación del conidióforo (Etxebeste *et al.*, 2010). El primer gen específico de la ruta CDP es *brlA* (CDP) y su activación marca la transferencia del control del desarrollo asexual de la ruta UDA a la ruta CDP (Mah y Yu, 2006). Sin embargo, aunque los UDA activan a *brlA*, se ha sugerido que factores de la ruta UDA actúan también tras la

inducción de la ruta CDP, ya que por ejemplo, el UDA FlbB (ver sección 4.3.2) se localiza también en la punta de las méculas (Etxebeste *et al.*, 2009a).

4.3.1. Ruta central de la conidiación.

El FT *brlA* constituye el elemento central de la ruta CDP. Se trata del primer gen que es común a todos los estímulos inductores y cuya activación es imprescindible para que se materialicen la mayoría de cambios morfológicos necesarios para la generación del conidióforo (Yu *et al.*, 2006). El gen *brlA* codifica un FT con dos dominios de dedo de zinc tipo C₂H₂ (Adams *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1990). Su delección impide la conidiación bloqueando la transición entre el crecimiento polar del tallo y la expansión isotrópica de su punta para generar la vesícula (Clutterbuck, 1969). Por ello, el fenotipo del mutante nulo de *brlA* ha sido definido como *bristle*, debido a que el desarrollo del conidióforo queda bloqueado en el tallo, dando una apariencia de cerdas o pelos gruesos (Clutterbuck, 1969). Por el contrario, la sobreexpresión de *brlA* en hifas vegetativas da como resultado la producción de conidios en la punta de la hifa, emulando la funcionalidad de una fiálida (Adams *et al.*, 1988).

La transcripción de *brlA* puede dar lugar a dos transcritos, *brlA α* y *brlA β* (Han *et al.*, 1993; Prade y Timberlake, 1993). Los datos sugieren que *brlA β* es necesario en las etapas tempranas del desarrollo, mientras que *brlA α* se requeriría en etapas posteriores. *brlA β* codifica el mismo polipéptido que *brlA α* , pero, con 23 aminoácidos adicionales en la región N-terminal (Fischer y Kües, 2006). Sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo de acción de cada uno de los péptidos derivados de dichos transcritos, así como la relación funcional entre ellos o el modo en que estos 23 aminoácidos adicionales pueden afectar a la función transcripcional de BrIA.

Como elemento central de la ruta CDP y esencial para la consecución de los cambios morfológicos descritos, BrIA controla la transcripción de un amplio número de genes (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009). Uno de ellos es *abaA*, el cual, codifica un FT tipo ATTS que

regula la diferenciación de las fiálidas (Andrianopoulos y Timberlake, 1991; Sewall *et al.*, 1990a). Su activación conlleva la de otros genes necesarios para la conidiación, como *wetA*, requerido para la síntesis de componentes esenciales de la pared celular de los conidios (Marshall y Timberlake, 1991; Sewall *et al.*, 1990b). Estos tres genes, *brlA*, *abaA* y *wetA*, forman el eje central de la ruta CDP y en coordinación con otros elementos permiten un correcto control espacial y temporal de la reproducción asexual (Boylan *et al.*, 1987; Mirabito *et al.*, 1989). La correcta regulación de este eje central, sin embargo, implica también el control de su expresión a través de bucles de regulación específicos. Así, se sugirió que *AbaA* ejerce una represión de la expresión *brlA* cuando está presente en bajas concentraciones, aunque a altas concentraciones ejerce un papel positivo (Aguirre, 1993).

StuA y *MedA* (Clutterbuck, 1969) se consideran reguladores auxiliares de la ruta CDP y codifican proteínas que afectan a la expresión de *brlA* y *abaA* ((Adams *et al.*, 1998) y referencias allí citadas). Se ha propuesto que *StuA* controla la correcta expresión espacial de *abaA* y *brlA*, mientras que *MedA* ejercería un control temporal (Adams *et al.*, 1998). Mutaciones en *stuA* y *medA* dan lugar a cepas que mantienen la capacidad de formar conidios viables, pero donde los conidióforos presentan varias alteraciones morfológicas (Clutterbuck, 1969). Finalmente, *VosA*, otro FT de la ruta CDP, actúa aguas abajo de *BrlA* y es esencial para la maduración de los conidios y la biogénesis de la trealosa, un disacárido que permite el almacenamiento de energía y la estabilización y protección de estructuras de membrana (Ni y Yu, 2007). *vosA* se expresa durante la formación de conidios (fases finales de la conidiogénesis), activa a *wetA* y reprime a *brlA* para cerrar así el ciclo asexual (Ni y Yu, 2007).

4.3.2. Ruta de Inducción temprana.

La ruta UDA incluye múltiples proteínas que garantizan en hifas vegetativas la correcta transducción de las señales inductoras al promotor de *brlA* (Etxebeste *et al.*, 2010; Wieser *et al.*, 1994). Los mutantes de pérdida de función de casi todos los genes UDA presentan un

fenotipo aconidial o de conidiación retardada comúnmente denominado *fluffy*, caracterizado por un aspecto algodonoso de las colonias y causado por la disminución, retraso o ausencia de la expresión de *brlA*.

El primer elemento conocido en la ruta es *fluG* (Figura 1.4) (Lee y Adams, 1994; Lee y Adams, 1996). Además de ser necesario para la síntesis de un metabolito extracelular requerido en la inducción de la conidiación (ver apartado 4.1), se ha propuesto que FluG ejerce directa o indirectamente dos funciones clave para la activación de los genes UDA conocidos como *flb-s* (del inglés: *fluffy, low brlA expression*) (Etxebeste *et al.*, 2010). Por un lado, bloquearía el crecimiento vegetativo a través de la activación de FlbA, una proteína que regula la señalización mediada por el complejo G heterotrimérico compuesto por FadA, GpgA y SfaD (Rosen *et al.*, 1999; Yu, 2006). Por el otro lado, levantaría la represión ejercida por la proteína SfgA, un FT del tipo $Zn(II)_2Cys_6$, sobre la expresión de los *flb-s* (Figura 1.4) (Seo *et al.*, 2006). Una vez levantada dicha represión, los productos de los genes *flb* podrían inducir la expresión de *brlA*. El establecimiento de un marco temporal para la expresión de los genes *flb* y la actividad de las proteínas correspondientes, así como la determinación de los compartimentos subcelulares donde desempeñarían su actividad, ha permitido durante los últimos años profundizar en los mecanismos moleculares a través de los cuales la ruta UDA controla la expresión de *brlA* (Etxebeste *et al.*, 2010; Oiartzabal-Arano *et al.*, 2016; Park y Yu, 2012).

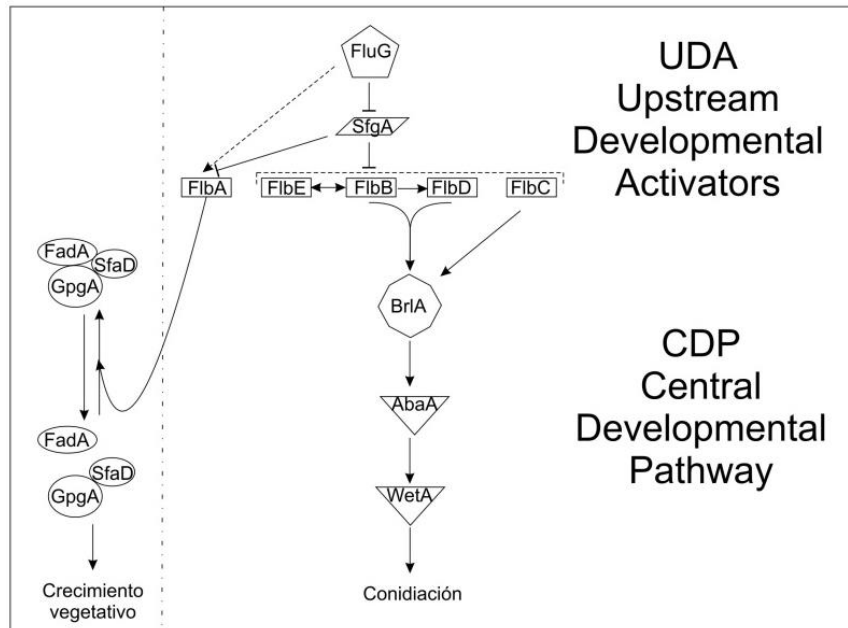


Figura 1.4. Modelo genético para el control de la expresión de *brlA* y el desarrollo de conidióforos. Los genes *fluG*, *sfgA*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* componen la ruta de inducción temprana (UDA). *fluG* se sitúa aguas arriba de los genes *flb* y la proteína que codifica realiza dos funciones principales para la activación de éstos. Por un lado, inhibe el crecimiento vegetativo activando a *flbA* y, por el otro lado, levanta la represión ejercida por la proteína *SfgA*, permitiendo la activación de la expresión de *brlA*. Para ello, las proteínas *FlbB*/*FlbE*/*FlbD* actuarían coordinadamente mientras que *FlbC* se situaría en una sub-ruta diferente que ejercería su actividad transcripcional directamente sobre *brlA*. Tras la activación de *brlA*, la ruta CDP, cuyo eje está formado también por *abaA* y *wetA*, regula la formación del conidióforo. Modificado a partir de la tesis doctoral de la Dra. Herrero-García (Herrero-García, 2013).

FlbC es un FT que contiene dos dominios de unión a DNA del tipo C_2H_2 . Su localización subcelular es nuclear, con una distribución homogénea en todos los núcleos de la hifa vegetativa (Kwon *et al.*, 2010). Es capaz de unir directamente al promotor de *brlA*, habiéndose propuesto que a nivel genético actúa en una sub-ruta diferente a la definida por *flbB*, *flbE* y *flbD* (ver párrafo siguiente).

FlbB es un FT de tipo bZIP (del inglés, *basic leucine zipper*; cremallera de leucina) esencial para la inducción de la conidiación (Adams *et al.*, 1998; Etxebeste *et al.*, 2008) y que presenta en hifas vegetativas una localización subcelular muy característica. Por un lado, se localiza en el ápice de las hifas, siendo excluido del anillo de endocitosis, y, por el otro lado,

también se acumula en los núcleos. Sin embargo, la localización nuclear de FlbB sigue un gradiente de concentración. Es el núcleo más apical, el más cercano a la punta, el que muestra mayor concentración de FlbB (Etxebeste *et al.*, 2008). Este UDA constituye el primer ejemplo conocido de un FT localizado en la punta de las hifas de hongos filamentosos (Etxebeste *et al.*, 2008) y, en base a ello, se ha propuesto que desempeña un papel sensorial en esta región ((Oartzabal-Arano *et al.*, 2016) y referencias allí citadas). Dicha localización apical es actino-dependiente, mientras que los MMTT no parecen desempeñar un papel esencial (Herrero-García *et al.*, 2015). Es observable desde la emergencia del tubo de la germínula en una espora, y se mantiene durante todo el ciclo celular siempre que la hifa se extienda apicalmente (Etxebeste *et al.*, 2009a;Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014).

El transporte acropetal y la acumulación apical de FlbB dependen de la actividad FlbE (Garzia *et al.*, 2009;Herrero-García *et al.*, 2015). Experimentos preliminares llevaron a proponer que ambas proteínas actuaban al mismo nivel en la ruta UDA, demostrándose finalmente que interactúan en la punta de las hifas vegetativas (Garzia *et al.*, 2009). Dicha interacción parece estar mediada por los dominios bZIP y C-terminal de FlbB, siendo desconocidos aún los dominios de FlbE necesarios (Herrero-García *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos hasta ahora indican que cualquier alteración genética que causa una reducción en la acumulación apical de FlbB inhibe su actividad transcripcional y la capacidad de producir esporas asexuales. Por ello, es importante conocer los mecanismos que permiten la acumulación apical de FlbB y cómo esta población se comunica con la nuclear (Herrero-García *et al.*, 2015).

El etiquetado de FlbB con el epítipo fotoconvertible Dendra2 permitió demostrar que FlbB migra desde la punta de la hifa vegetativa a los núcleos (Herrero-García *et al.*, 2015). Su dominio bZIP tiene capacidad de unión a DNA y reconoce *in vitro* secuencias diana similares a las descritas previamente para los factores de la familia AP-1 (Etxebeste *et al.*, 2009a), FTTT del

tipo bZIP que activan la respuesta celular en condiciones de estrés oxidativo (Asano *et al.*, 2007;Castillo *et al.*, 2002). En el núcleo, FlbB induce la expresión *flbD*, el cual codifica un FT de la familia c-Myb (Wieser y Adams, 1995). Posteriormente, ambos factores activan conjuntamente la expresión de *brlA* por unión directa a su promotor (Garzia *et al.*, 2010). FlbD muestra una localización nuclear en hifas vegetativas y FlbB es incapaz de unir al promotor de *brlA* en un fondo genético nulo en *flbD* (Garzia *et al.*, 2010). Estos resultados indican que FlbD podría jugar un papel importante en la actividad transcripcional de FlbB, pero se desconoce si lo hace permitiendo su acumulación nuclear, su unión a DNA o ambas. Tampoco se ha analizado si la actividad transcripcional de FlbB se limita al control de la expresión de *brlA* o si hay otros procesos celulares que se ven alterados como consecuencia de la inhibición de la conidiación descrita en el mutante $\Delta flbB$.

Objetivos.

Objetivos:

Dos son los puntos principales en torno a los cuales se agrupan los objetivos experimentales de esta tesis doctoral:

- 1) Identificar, y en los casos de interés, caracterizar los procesos celulares desregulados en ausencia de actividad FlbB más allá de la inhibición de *flbD* y *brlA*, ya descrita en estudios anteriores.
- 2) Realizar un primer análisis experimental del mecanismo de transporte basipetal de FlbB centrándose en dos tareas. Por un lado, el estudio del papel de sus dominios funcionales. Por el otro lado, el análisis del posible papel del factor de transcripción FlbD en la acumulación nuclear de FlbB. Ello permitirá profundizar en la relación funcional de ambos factores UDA en la inducción de la conidiación.

Materiales y métodos.

1.- Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados.

1.1. Cepas de *A. nidulans*.

Las cepas utilizadas en este trabajo quedan recogidas en la Tabla 2.1:

Cepa	Genotipo	Fuente
BD1	<i>biA1; veA1</i>	(Kafer, 1965)
TTA127.4	<i>pabaA1, ya2; ΔfluG::trpC; veA1</i>	(Lee y Adams, 1994)
BD142	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::pyrG^{Af}</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD143	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD167	<i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD177	<i>pyrG8; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD178	<i>pyrG89; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB^{Af}, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD185	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2009a)
BD197	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbD::pyrG^{Af}</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD209	<i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB^{Af}</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD246	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD::gfp::pyrG^{Af}</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD271	<i>pyrG89; argB2; pabaB22, pyroA⁺::[alcA(p)::flbD]::pyroA4*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB^{Af}</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD375	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD::HA_{3x}::pyrG^{Af}</i>	Dr. Garzia
BD376	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔbrlA::pyrG^{Af}</i>	Dr. Garzia, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
MAD2666	<i>argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Markina-Inarrairaegui <i>et al.</i> , 2011) Cepa construida mediante la transformación del fragmento <i>pyrG^{Af}</i> en el locus <i>pyrG</i> de la cepa MAD1425 (<i>pyrG89</i>).
BD388	<i>pyrG89; gfp::flbB, inoB2, pyroA4; hhoA::mCh::pyroA; veA1</i>	Dr. Etxebeste, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD407	<i>pyrG89; argB2; flbB^(K67A;R68A)::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD429	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔgmcA::pyrG^{Af}; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2012)

BD455	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB^(K67A;R68A), pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD549	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔAn8910::pyrG^{Af}; veA1</i>	Este estudio
BD551	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; Δ8910::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Este estudio
BD552	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔAn2578::pyrG^{Af}; veA1</i>	Este estudio
BD554	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔAn2578::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Este estudio
BD557	<i>pyrG89; ΔdbaA::pyrG^{Af}; argB2, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio
BD558	<i>pyrG89; ΔdbaA::pyrG^{Af}; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD565	<i>pyrG89; ΔdbaG::pyrG^{Af}; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio
BD567	<i>pyrG89; ΔdbaG::pyrG^{Af}; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD570	<i>pyrG89; ΔcipB::pyrG^{Af}; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio
BD571	<i>pyrG89; ΔcipB::pyrG^{Af}; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD614	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; Δ(An2030-An2038)::pyrG^{Af}; veA1</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD636	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(K67A;R68A)]_{1x}::pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD679	<i>pyrG89; argB2, ΔurdA::pyrG^{Af}; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD682	<i>pyrG89; argB2, ΔurdA::pyrG^{Af}; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Oartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD699	<i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1</i>	Dr. Etxebeste, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD702	<i>pyrG89; argB2; flbB^(K67A;R68A)::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD705	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB^(K67A;R68A), pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD717	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; hhoA::mrfp::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Dr. Etxebeste, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD719	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(K67A;R68A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; hhoA::mrfp::pyrG^{Af}; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
BD789	<i>pyrG89; argB2, urdA::gfp::pyrG^{Af}; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio
BD792	<i>pyrG89; argB2, urdA::gfp::pyrG^{Af}; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio
BD796	<i>pyrG89; ΔdbaD::pyrG^{Af}; argB2; pyroA4,</i>	Este estudio, (Oartzabal-

	$\Delta nkuA::argB; veA1$	Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD798	$pyrG89; \Delta dbaD::pyrG^{Af}; argB2; \Delta flbB::riboB^{Af}; pabaB22, pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1, riboB2$	Este estudio, (Oiartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD801	$pyrG89; \Delta dbal::pyrG^{Af}; argB2; pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1$	Este estudio, (Oiartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD804	$pyrG89; \Delta dbal::pyrG^{Af}; argB2; \Delta flbB::riboB^{Af}; pabaB22, pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1, riboB2$	Este estudio, (Oiartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD808	$pyrG89; argB; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, \Delta nkuA::argB; kapA31; veA1$	Dr. Etxebeste
BD836	$pyrG89; argB2, urdA^{+}_{(recomp.)}; pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1$	(Oiartzabal-Arano <i>et al.</i> , 2015)
BD845	$pyrG8; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pabaB22, pyroA4, \Delta nkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1, riboB2, \Delta flbD::riboB^{Af}$	Este estudio
BD852	$pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pabaB22, pyroA^{+}::[alcA(p)::flbD]::pyroA4^{*}, \Delta nkuA::argB; veA1, riboB2, \Delta flbD::riboB^{Af}$	Este estudio
BD914	$pyrG89; argB2; pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1, flbDp::gpdA^{mini}::flbD::gfp::pyrG^{Af}$	Este estudio
MAD1425	$pyrG89; argB2; pyroA4, \Delta nkuA::argB; veA1$	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
MAD1545	$pyrG89; argB2; pyroA4, \Delta nkuA::argB, kapA31; veA1$	(Araujo-Bazan <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 2.1: Cepas de *A. nidulans* utilizadas durante la realización de esta tesis doctoral.

1.2. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados son los siguientes (Tabla 2.2):

Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
FOR.An0676	CCAATGCGGCAATAACGTTG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>mipA</i>
REV.An0676	CCTCCAAGTTTCCATCCTGAC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>mipA</i>
PRB.An0676	ATTCCGTGCTCGAGACATAGCTGTTG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>mipA</i>
2030-GSP3	TAAAATTTAGTACGGCTGAGGGGAAACC	Obtención cepa $\Delta(An2030-An2038)::pyrG^{Af}$
2030-GSP4	GCTTTGGGCAGACGACCTCG	Obtención cepa $\Delta(An2030-An2038)::pyrG^{Af}$
2030-SMP1	GGTTTCCCCTCAGCCGTAATAATTTAACC GG TCGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta(An2030-An2038)::pyrG^{Af}$
2038-GFP2	CCAGCTTTGATCAGTTCCATTCATCGTATCAAC	Obtención cepa

	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	$\Delta(\text{An2030-}\text{An2038})::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
2038-PP2	GTTGATACGATGAATGGAAGCTGG	Obtención cepa $\Delta(\text{An2030-}\text{An2038})::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
2038-PP1	CAGGTCCTGTTTCAGAACGCAGCC	Obtención cepa $\Delta(\text{An2030-}\text{An2038})::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-PP1	GTGCCTAGGACTCAAACATGTTTGCC	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-PP2	CATTGTGAGTCTCGAGATTGTATAAATGATTGAAGTCTAAGC	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-GSP3	TAAAATACGTGGCTTCTGCTGATAGAGGG	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-GSP4	GCTGTCAGCCTCATTGCGACCC	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-SMP1	GCTTAGACTTCAATCATTTATACAATCTCGAGACTCACAATGACCGGTCGCCCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An2578-GFP2	CCCTCTATCAGCAGAAGCCACGTATTTTAGCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta\text{An2578}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-PP1	GAGAGTTTACCCATGCAGCGAGCTCCG	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-PP2	CATTGCGTCGATAAAGAGTCGATGTTTCTCTGTCTCTGTAGC	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-SMP1	GCTACAGAGACAGAGAAACATCGACTCTTTATCGACGCAATGACCGGTCGCCCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-GFP2	GCTGCCGTCTCACCATGCTCTTGGCTAGTCTGAGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-GSP3	TAGCCAAGAGCATGGTGAGACGGCAGC	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
4394-GSP4	GCAACGGATCGACGAAGGAGGGC	Obtención cepa $\Delta\text{urdA}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An4394Up	GGCCTCTGCAGCAGTGTGG	Generación sonda <i>urdA</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
An4394Dw	GAAAGATAGCGGTCGTGAAGCTGC	Generación sonda <i>urdA</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
FOR.An6542	AGTTGCTGCTCTCGTTATCG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>actA</i>
REV.An6542	CTTCTGACCCATACCGATCATG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>actA</i>
PRB.An6542	TGCCGTCTCCCTCCATTGTC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>actA</i>
An7895-PP1	GTGAGCCAACCTTTGTAAAGAGCAACGG	Obtención cepa $\Delta\text{cipB}::\text{pyrG}^{\text{Af}}$
An7895-PP2	CATATAAAGGCGTTTCTGGGAGAAGTATATCG	Obtención cepa

	AGG	$\Delta cipB::pyrG^{Af}$
An7895-GSP3	TGATTGTCTCACCTGTGGACCTGC	Obtención cepa $\Delta cipB::pyrG^{Af}$
An7895-GSP4	GAGGGTGCTAAGTTCATGGCAGACG	Obtención cepa $\Delta cipB::pyrG^{Af}$
An7895-SMP1	CCTCGATATACTTCTCCCAGAACCGCCTTTATAT GACCGGTCGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta cipB::pyrG^{Af}$
An7895-GFP2	GCAGGTCCACAGGTGAGACAATCAGTCTGAGA GGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta cipB::pyrG^{Af}$
FOR.An7895	CAAGGCAATCTACGAGGACTAC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7895</i>
REV.An7895	TCTCTAATCCCTTCCCAGCC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7895</i>
PRB.An7895	TCGTTTCATCCCTGCCCTGTC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7895</i>
An7895cDNAForw	CCTCGATATACTTCTCCCAGAACCGC	Secuenciación de <i>cipB</i> para diseño de ensayo qPCR
An7895cDNARev	GAAGGCCTATACTAGCAGGTCCACAGG	Secuenciación de <i>cipB</i> para diseño de ensayo qPCR
CipB-Fw	CGCAAGCCTTTTCTTCGCAGC	Generación sonda <i>cipB</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
CipB-Rev	CTCTCTAATCCCTTCCCAGCCACG	Generación sonda <i>cipB</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
An7896-PP1	GCTATGGGAAATGTGCAATCCAGG	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
An7896-PP2	CATCGTCTAGCTGGGGTTCTGAATC	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
An7896-GSP3	TAGAAATTAAGACGGCCTTTTCTTTCTTG	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
An7896-GSP4	GGCATTGACGGTCCACTGGG	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
An7896-SMP1	CGATTCAGGAACCCAGCTAGACGATGACCGG TCGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
An7896-GFP2	CAAGAAAGGAAAAAGCCGTCTTAATTTCTAG TCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta dbaA::pyrG^{Af}$
FOR.An7896	GCAGGAAATTGTGGACTTGAC	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7896</i>
REV.An7896	AAAGAGGAATGGGCGTTAGAG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7896</i>
PRB.An7896	TGCACCTTCAACGAGTTCAAATGCGATA	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>An7896</i>

An7896cDNAForw	CGATTCAGGAACCCCAGCTAGACG	Secuenciación de <i>dbaA</i> para diseño de ensayo qPCR
An7896cDNARev	CATTTAACAAGAAAGGAAAAAGCCGTC	Secuenciación de <i>dbaA</i> para diseño de ensayo qPCR
An7896ForwardII	CCCGTTGAACTGACAATGCCG	Secuenciación de <i>dbaA</i> para diseño de ensayo qPCR
An7898-PP1*	CAAAGGGTGCCTCGGCATAGACG	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-PP2	CATGTTGACCGTGGTGTATTTTGAGAAGTCG	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-GSP3	TGATCGAGTGTTTAATGGAAAAAGTTCATATTG ATTTCCG	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-GSP4*	CCGCCGAATGTTACCCATCG	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-SMP1	CGACTTCTCAAATACACCACGGTCAACATGAC CGGTGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-GFP2	GCGAAATCAATATGAACTTTTCCATTAAACAC TCGATCAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta dbaD::pyrG^{Af}$
An7898-Fw	GACCTCCTGCCCTCCTCC	Generación sonda <i>dbaD</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
An7898-Rv	CCGAAGAAACCCGAGAGCAGC	Generación sonda <i>dbaD</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
An7901-PP1	CTAGTCCTATAATCTCGTCCCTTCCCTTCG	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
An7901-PP2	CATGGTGTCTGTGCCTGGC	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
An7901-GSP3	TAGTCCAGCTGAATTAGCACTAACTTATATAGG CTCC	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
An7901-GSP4	CTTTGAGCAATCCCAGGGTTTCCG	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
An7901-SMPyrG1	GCCAGGCACAGACACCATGACCGGTGCCTCA ACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
An7901-GFP2	GGAGCCTATATAAGTTAGTGCTAATTCAGCTG GACTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta dbaG::pyrG^{Af}$
FOR.An7901	GCAGATCGAAAATAGTCCTTTGG	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>dbaG</i>
REV.An7901	ACCAGGGGAAGGGCTAATA	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>dbaG</i>
PRB.An7901	ACCGGATGGTGCAGAATAATGGAATGT	Cuantificación Real-Time PCR de la expresión de <i>dbaG</i>
An7901cDNAForw	GTTTATCTCCGCGGGCTCC	Secuenciación de <i>dbaG</i> para diseño de ensayo qPCR

An7901cDNARev	GACTGCGATTTCAGCAAGCG	Secuenciación de <i>dbaG</i> para diseño de ensayo qPCR
An7901ForwardII	GGCGGCTATCTTGCAGATCG	Secuenciación de <i>dbaG</i> para diseño de ensayo qPCR
An7902-PP1	GGGTGTTGGGCAGTGGGAAGC	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7902-PP2	CATCGTAGGGATGATTTGGTAATTAATCG	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7902-GSP3	TAGTGTGGTGTGAAATATTATCAGAGGGTC ATCG	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7902-GSP4	CGAACCTATGGTCCACAGACTCGG	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7902-SMP1	CGATTAATTACCAATCATCCCTACGATGACCG GTCGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7902-GFP2	CGATGACCCTCTGATAATTTCAACACCAAAC ACTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta dbaH::pyrG^{Af}$
An7903-PP1	CTTTTCGTGCGCGGTAGAGGTAGG	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An7903-PP2	CATTTTCCTGCCTGTTCTAGTGCG	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An7903-GSP3	TGATGTCCTTACCTCAGCTTTTGTTC	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An7903-GSP4	GTCACCCACAAGGCCTGTTC	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An7903-SMP1	CGCACTAGAACAGGCAGGAAAATGACCGGTC GCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An7903-GFP2	GCAAACAAAAGCTGAGGTAAAGGACATCAGTC TGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta dbaL::pyrG^{Af}$
An8910-PP1	GAGGACTTCGGCGTATGAGCTCC	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
An8910-PP2	CATGATAATGTTTACTTGCAGTGCAGGATACGC	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
An8910-SMP1	GCGTATCCTGCACTGCAAGTAAACATTATCATG ACCGGTCGCCTCAAACAATGCTCT	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
An8910-GFP2	GGACATCGTAGACGCAGAGATGCTCAGTCTGA GAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
An8910-GSP3	TGAGCATCTCTGCGTCTACGATGTCC	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
An8910-GSP4	CAACCATGCTATCCTCTGCAGTGATCCC	Obtención cepa $\Delta An8910::pyrG^{Af}$
brlAprobe sens.	CCATGCAGATCAGCCCTC	Generación sonda <i>brlA</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
brlAprobe antis.	CGGAATTCGTAAACTGAACGGTGCTCTGG	Generación sonda <i>brlA</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
GST-FIbB1	CGGGATCCATGACTTCGATCAGTAGTAGGC	Generación sonda <i>flbB</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>

GST-FlbB2	CGGAATTCCTGTCAGGTCATGAATACATCG	Generación sonda <i>flbB</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
NsdD-Fw	GGATCATCTCCCCGCTATTGG	Generación sonda <i>nsdD</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
NsdD-Rv	GGTGCCCGAAGGAACCTGTAACC	Generación sonda <i>nsdD</i> para hibridación <i>Northern-blot</i>
hhoA-GSP5	CTACAGTTGAGCCTATGCACAAG	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
hhoA-GSP6	GGCCTTCTTGTCTTAGCAGTC	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
hhoA-GSP3	ACAGGCAGCCTGGCTTGG	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
hhoA-GSP4	GCAACAGTCGACAGCACAGC	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
hhoA-GSP3'	CCAAGCCAGGCTGCCTGTCTGTCTGAGAGGAG GCACTGATGC	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
hhoA-GSP6'	GACTGCTAAGAACAAGAAGGCCGGAGCTGGT GCAGGCGCTGGAGCC	Construcción de <i>hhoA::mCh/mRFP::pyroA^{Af}</i> (cortesía del Dr. Eduardo Espeso)
flbB-NLS(+1)	GGGCAACCTGCCGAGCAAGAGGACCAAAAC CC	Inserción de mutaciones (K67A;R68A) en señal de localización nuclear (NLS).
flbB-NLS(-1)	GGGTTTTGGTCCTCTTGCTGCGGCAGGTTGCCC	Inserción de mutaciones (K67A;R68A) en señal de localización nuclear (NLS).
urdA gfp GSP1	GTGTTGCCACCTGCTGTCTCTCTCC	Obtención cepa <i>urdA::GFP::pyrG^{Af}</i>
urdA gfp GSP2	TGGCGATTGAATGAAAGATAGCGGTCCG	Obtención cepa <i>urdA::GFP::pyrG^{Af}</i>
urdA gfp GFP1	CGACCGCTATCTTTCATTCAATCGCCAGGAGCT GGTGCAGGCGCTGGAGCC	Obtención cepa <i>urdA::GFP::pyrG^{Af}</i>
flbB-PP1	GTTTTCTGGTCCTCGGTCAACCGGTGG	Obtención cepa <i>GFP::flbB^(K67A;R68A)</i>
flbB (Sek3)	GGCGCTGGAGGACAGGC	Secuenciación de flbB

FlbB-GSP1	CCTCTTGTGGATGCACTCTGGAATGTGGGC	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
FlbB-GSP2	TGAATACATCGTCTCATCAGCATGCCGGGT	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
FlbB-GSP3	TGACCTGACAGCTCGCTTTTTTCTGAGCTTTCT AATGC	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
FlbB-GSP4	GAAAGGTGCGTGGGTTCGAATCCCACC	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
FlbB-GFP1	TCCCGGCATGCTGATGAGACGATGTATTCAGG AGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
FlbB-GFP2	GCATTAGAAAGCTCAGAAAAAAGCGAGCTGT CAGGTCAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Obtención cepa <i>flbB::GFP::pyrG^{Af}</i>
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de insertos <i>cipB</i> , <i>dbaA</i> y <i>dbaG</i> en plásmido pGEM- T-easy
SP6	ATTAGGTGACTATAG	Secuenciación de insertos <i>cipB</i> , <i>dbaA</i> y <i>dbaG</i> en plásmido pGEM- T-easy

Tabla 2.2: Lista de oligonucleótidos utilizados durante la realización de esta tesis doctoral.

1.3. Plásmidos.

1.3.1. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *Escherichia coli*.

- **pGEX-2T (Pharmacia):** Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína Glutathion S-Transferasa (GST) (control) y fusiones de GST a la parte amino terminal de las proteínas. Este plásmido se utilizó como base para la generación de los plásmidos descritos a continuación.
- **pGEX-FlbB1-426:** Plásmido que integra el cDNA completo de *flbB* para la expresión en *E. coli* de la fusión GST::FlbB (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 67-140:** Plásmido que integra la región del cDNA correspondiente al dominio bZIP de FlbB (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 1-426^(L104A; E105A):** Construcción generada por Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi que contiene una doble mutación (L104A; E105A) en la región definida como de dimerización (DIM) dentro del dominio bZIP de FlbB (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).

- **pGEX-FlbB 1-426^(N86A; R87A)**: Construcción generada por el Dr. Oier Etxebeste que contiene una doble mutación (N86A; R87A) en la región definida como de unión a DNA (DBD) dentro del dominio bZIP de FlbB.
- **pGEX-FlbB 1-426^(K67A; R68A)**: Construcción que incluye una doble mutación (K67A; R68A) en la señal de localización nuclear (NLS) (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 1-426^(C382A)**: Construcción que contiene una sustitución de la cisteína en la posición 382 de FlbB por una alanina (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).

El plásmido pGEX-FlbB 1-426 fue generado por la Dra. Herrero-Garcia, y el plásmido pGEX-FlbB 67-140 por el Dr. Oier Etxebeste.

1.3.2. Plásmidos utilizados en *A. nidulans*.

- **pBSK-*pyroA**::GFP::FlbB 1-426**: Plásmido construido por el Dr. Etxebeste (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), el cual, se integra por recombinación en el *locus pyroA*. Su transformación en una cepa de genotipo *pyroA4* genera dos copias del gen, una *pyroA4* truncada y otra *pyroA* silvestre. Esta última confiere el fenotipo *pyroA*⁺.
- **pBSK-*pyroA**::GFP::FlbB 1-426^(K67A; R68A)**: Plásmido generado a partir del anterior y que contiene la doble mutación (K67A;R68A). Fue generado con los oligonucleótidos flbB-NLS(+1) y flbB-NLS(-1) (ver Tabla 2.2) mediante el protocolo descrito en la sección 5.2 de este capítulo.
- ***gpdA*^{mini}::GFP::FlbB 1-426-*pyroA****: Plásmido con la secuencia correspondiente a la quimera GFP::FlbB bajo el promotor constitutivo *gpdA*^{mini} (Pantazopoulou y Penalva, 2009). Este plásmido, generado por la Dra. Herrero-Garcia (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), se integra por recombinación en el *locus pyroA*.
- ***gpdA*^{mini}::GFP::FlbB 1-426^(K67A; R68A)-*pyroA****: Plásmido construido a partir del molde anterior y que contiene la doble sustitución (K67A; R68A). Fue generado utilizando los oligonucleótidos flbB-NLS(+1) y flbB-NLS(-1) (ver Tabla 2.2), siguiendo el protocolo del apartado 5.2.

1.3.3. Plásmidos utilizados en secuenciaciones de DNA.

A través de la comparación entre la secuencia genómica de un gen y su cDNA, el objetivo fue confirmar la correcta anotación de las secuencias codificantes de aquellos genes cuya expresión se pretendía analizar por qPCR (ver apartado 5.7) y poder diseñar así las correspondientes sondas y oligonucleótidos.

- **pGEM-An7895cDNA:** Una muestra de RNA total extraída a partir de una cepa $\Delta flbB$ 6 h después de inducir la conidiación fue el molde para amplificar el cDNA del gen *An7895* con los oligonucleótidos An7895cDNAForw y An7895cDNARev. Este fondo genético y las condiciones de extracción de RNA (apartado 5.4) garantizaban la presencia del transcrito correspondiente, en base a los resultados de RNA-seq de los que se disponía. Para la amplificación se utilizó el kit One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Takara). Posteriormente, el cDNA se ligó en el plásmido pGEM-T-easy (Promega) y se secuenció utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6. Por otro lado, la amplificación por PCR a partir del DNA genómico (gDNA) de la cepa BD1 dio como resultado un fragmento de igual tamaño al producto amplificado a partir de la muestra de RNA, confirmando la ausencia de intrones previamente establecida en el experimento de secuenciación masiva de RNA. Por todo ello, no se realizó la secuenciación de dicho fragmento de DNA proveniente del gDNA.
- **pGEM-An7896cDNA y pGEM-An7896DNA:** A partir de la misma muestra de RNA y utilizando los oligonucleótidos An7896cDNAForw y An7896cDNARev, se amplificó el cDNA del gen *An7896*. En paralelo, y a partir de una muestra de gDNA de la cepa BD1, se amplificó la secuencia genómica correspondiente que tenía un tamaño mayor. Ambos se introdujeron en plásmidos pGEM-T-easy para ser secuenciados con los oligonucleótidos T7, SP6 y An7896ForwardII.
- **pGEM-An7901cDNA y pGEM-An7901DNA:** Los oligonucleótidos An7901cDNAForw y An7901cDNARev se emplearon para analizar la secuencia codificante del gen *An7901*.

Los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el inserto fueron T7, SP6 y An7901ForwardII.

2.- Condiciones y medios de cultivo para *A. nidulans*.

Las cepas de *A. nidulans* se cultivaron siguiendo los protocolos estandarizados del Laboratorio de Bioquímica II (Pontecorvo *et al.*, 1953). La composición de los medios se describe en la Tabla 2.4. De forma generalizada, se utilizaron medio mínimo (MMA) o medio completo (MCA; MMA + 5 g/L extracto de levadura) con D-glucosa (2% p/v) y tartrato de amonio (5 mM) como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y los suplementos adecuados para cada cepa (ver Tabla 2.3). Sin embargo, en casos específicos que serán adecuadamente indicados se utilizaron sacarosa (1 M), etanol (1% (v/v)) o treonina (100 mM), y NaNO₃ (70 mM) como fuentes de carbono y nitrógeno alternativos. Los cultivos se incubaron preferentemente a 37°C y en casos específicos a 25 o 30°C.

El desarrollo asexual se indujo a través de un procedimiento inicialmente descrito por (Law y Timberlake, 1980) y (Aguirre, 1993). 10⁶ conidios/mL se cultivaron a 37°C durante 18 h y 200 rpm en MMA con los nutrientes necesarios. Tras este periodo, se filtraron a vacío alícuotas de 15 mL sobre membranas de nitrocelulosa ($d_p = 0,45\mu\text{m}$; diámetro membrana = 47mm; Scharlab). Las membranas se depositaron en placas de MMA sólido suplementado con los nutrientes requeridos, las cuales fueron cultivadas durante 6, 12, 24 y 48 h.

Disoluciones (Esterilizadas en autoclave a 110°C durante 20 min).	Preparación (por litro)
Disolución de elementos traza (1000x)	22.0 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 11.0 g H ₃ BO ₃ ; 5.0 g MnCl ₂ ·4H ₂ O; 5.0 g FeSO ₄ ·2H ₂ O; 1.6 g CoCl ₂ ·6H ₂ O; 1.6 g CuSO ₄ ·5H ₂ O; 1.1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O; 50.0 g Na ₂ EDTA; Ajustar el pH a 6.8 con KOH.
Disolución de sales y elementos traza (50x)	26.0 g de KCl; 26.0 g de MgSO ₄ ·7H ₂ O; 76.0 g de KH ₂ PO ₄ ; 50 mL de solución de elementos traza.
Disolución de glucosa (10x)	200.0 g glucosa.
Disolución de sacarosa (10x)	300.0 g sacarosa.
Disolución de tartrato amónico (100x)	92.0 g tartrato amónico.
Disolución de MgSO ₄ (20x)	10.4 g MgSO ₄ ·7H ₂ O.
Disolución de treonina (10x) (Utilizado en la inducción de <i>alcA</i> (p) en medio líquido).	120.0 g treonina (1000mM).
NaH ₂ PO ₄ 5M	599.9 g NaH ₂ PO ₄ .
Suplementos	Preparación (por litro)
Biotina (10 000x)	0.1 g biotina.
Ácido p-aminobenzoico (PABA) (1000x)	2.0 g ácido p-aminobenzoico. Esterilizado por autoclave.
Piridoxina (vitamina B6) (1000x)	0.5 g piridoxina. Esterilizado por filtración.
Inositol (100x)	12.0 g inositol. Esterilizado por autoclave.
Uracilo y uridina	Pesados en el momento de añadir al medio: 0.56 mg/mL de uracilo y 1.22 mg/mL de uridina en el medio.

Tabla 2.3: Disoluciones y suplementos de partida utilizados.

Medios de cultivo (Esterilizados en autoclave a 110°C durante 20 min).	Preparación (por litro)
Medio mínimo con tartrato amónico (MMA)	20 mL de solución de sales y elementos traza; Ajustar el pH a 6.8 con NaOH; 15.0 g agar (sólo para medio sólido); Esterilizado en autoclave; Añadir 100 mL solución de glucosa; Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico.
Medio completo sólido (MCA)	MMA + 5.0 g extracto levadura
Medio mínimo con nitrato (MMA-nitrato)	6.0 g NaNO ₃ ; 1.5 g KH ₂ PO ₄ 0.5 g KCl; 15.0 g agar (sólo para medio sólido); 1.0 mL elementos traza; Ajustar el pH a 6.8; Esterilizado en autoclave; Añadir 100 mL solución de glucosa; Añadir 50 mL de solución de MgSO ₄ .
Medio de regeneración (MMR) Medio de regeneración TOP (MMR-TOP)	20 mL de solución de sales y elementos traza; 342.0 g sacarosa (1 M); Ajustar el pH a 6.8 con NaOH; 15.0 g agar (6.0 g para MMR-TOP); Esterilizado en autoclave; Añadir 100 mL solución de glucosa; Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico.
Medio de Fermentación (MFA)	20 mL solución de sales y elementos traza; 25.0 g Corn Steep Liquor (CSL; Sigma-Aldrich); Ajustar el pH a 6.8 con NaOH; Esterilizado en autoclave; Añadir 100 mL solución de sacarosa; Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico.
Medio inductor del promotor de la alcohol deshidrogenasa, <i>alcA(p)</i> (MMT + 5Y) (Medio sólido)	20 mL de solución de sales y elementos traza; 12.0 g treonina (100mM); 5.0 g extracto de levadura; Ajustar el pH a 6.8 con NaOH; 15.0 g agar; Esterilizado en autoclave; Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico.
Watch Minimal Medium (WMM)	1 mL de elementos traza (1/1000); 0.5 g KCl (17 mM); 0.5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O (5 mM); Ajustar el pH a 6.8 con NaOH; Esterilizado en autoclave; Añadir 5 mL NaH ₂ PO ₄ 5 M (25 mM) + 5 mL solución de glucosa (0.1%) + 10 mL de solución de tartrato amónico (5 mM).

Tabla 2.4: Medios de cultivo para cepas de *A. nidulans*.

La sobreexpresión de genes bajo promotor *alcA* se indujo utilizando treonina (100mM) o etanol (1% (v/v)) como fuentes de carbono, mientras que se inhibió utilizando D-glucosa (2% (p/v)). Para la inducción en medio líquido, como se describe a continuación, se combinó el método de crecimiento estándar utilizado en el Laboratorio de Bioquímica II con el protocolo descrito en (Wieser y Adams, 1995). Las cepas primero se cultivaron a 37°C (10^6 conidios/mL) durante 18 h en MMA con glucosa. Tras este periodo, los micelios de las cepas se recogieron por filtración, se lavaron con MMA que contenía la fuente de carbono inductora y se cultivaron en este medio inductor durante 22 h. La morfología del micelio y la generación de conidióforos fueron analizadas utilizando un microscopio Optiphot (Nikon), en modo de contraste de fases y tomando las imágenes con una cámara Nikon FX-35DX.

Los análisis fenotípicos en condiciones de estrés se llevaron a cabo añadiendo NaH_2PO_4 (0.5 M), sacarosa (1 M), sorbitol (1.2 M), NaCl (0.8 M) o cicloheximida (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio).

3.- Recuento de conidios y cleistotecios.

El recuento de conidiosporas (conidios/ cm^2) se realizó según el método descrito por (Etxebeste *et al.*, 2012). Las cepas en MMA sólido se cultivaron a 37°C durante 72 h. Después se midió el diámetro de las colonias, se recogieron los conidios, se cuantificó el número total y se dividió por el área de la colonia, obteniendo el número de conidios por cm^2 .

El recuento de cleistotecios se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Herrero-García, 2013), el cual está basado a su vez en el método desarrollado por (Baidya *et al.*, 2011). Después de cultivar las cepas en MMA sólido a 37°C durante 156 h, se recogieron discos de 8 mm de diámetro de cada placa y se pulverizó etanol (70%) sobre la superficie del disco para eliminar los conidios y facilitar la visualización de cleistotecios. La cuantificación de los cleistotecios se realizó con una lupa binocular a 20x aumentos.

Los resultados proporcionados en ambos casos fueron los valores medios y error estándar de la media (*sem*, por sus siglas en inglés) obtenidos a partir de tres réplicas por cada cepa y condición analizada.

4.- Transformación de protoplastos de *A. nidulans*.

La obtención y posterior transformación de los protoplastos se realizó en base al método estándar del Laboratorio de Bioquímica II (Etxebeste, 2008), un protocolo modificado a partir del descrito por (Tilburn *et al.*, 1983). La composición de todas las disoluciones requeridas en este protocolo se recoge en la Tabla 2.5.

Solución	Composición
Solución 2 (50 mL) MgSO ₄ ·7H ₂ O (1.2 M)	14.9 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 1.8 mL Na ₂ HPO ₄ (0.2 M); 0.7 mL NaH ₂ PO ₄ (0.2 M); Enrasada hasta 50 mL con agua destilada y esterilizada por filtración.
Solución 5 (100 mL) Sorbitol (0.6 M) TrisHCl (0.1 M)	10.9 g Sorbitol; 10 mL TrisHCl (1 M, pH = 7.5); Enrasada con agua destilada hasta 100mL y esterilizada por autoclavado.
Solución 6 (100 mL) Sorbitol (1 M) TrisHCl (0.01 M)	18.22 g Sorbitol; 1 mL TrisHCl (1 M, pH = 7.5); Enrasada con agua destilada hasta 100 mL y esterilizada por autoclavado.
Solución 7 (100 mL) Sorbitol (1M) TrisHCl (0.01 M) CaCl ₂ (0.01 M)	18.22 g Sorbitol; 1 mL TrisHCl (1 M, pH = 7.5); 1 mL CaCl ₂ (1 M) Enrasada con agua destilada hasta 100 mL y esterilizada por autoclavado.
Solución 8 (50 mL) PEG (0.1 M) TrisHCl (0.01 M) CaCl ₂ (0.01 M)	30.0 g PEG (polietilenglicol, PEG6000, Fluka); 0.5 mL TrisHCl (1 M, pH = 7.5); 0.5 mL CaCl ₂ (1M); Añadir 5 mL de agua destilada, fundir el PEG en el microondas y enrasar hasta 50 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclavado.

Tabla 2.5: Soluciones empleadas en la obtención y transformación de protoplastos de *A. nidulans*.

La suspensión de conidiosporas de la cepa a transformar se inoculó en 300 mL de MMA líquido (10^6 conidios/mL) con las fuentes de carbono y nitrógeno estándar y los suplementos necesarios. El micelio se cultivó durante 16 h a 30°C en agitación (200 rpm) y se recolectó por filtración utilizando Miracloth estéril (EMD Millipore). A una muestra de 1.5-2.0 g de micelio húmedo se le añadieron 10 mL de Solución 2 y, tras mezclar, 300 mg/g de Glucanex® (Novozymes), una enzima lítica de la pared celular utilizada para obtener protoplastos. La mezcla se incubó en un matraz Erlenmeyer de 100 mL a 30°C y 110 rpm hasta que se observó la aparición de abundantes protoplastos libres (aproximadamente 90 min), tras lo cual, se procedió a su purificación y lavado.

La mezcla de digestión se transfirió a un tubo de polipropileno de 50 mL, se diluyó a la mitad añadiendo Solución 2 y se dividió en dos tubos (10 mL/tubo). Posteriormente, a cada tubo se añadieron lentamente 10 mL de Solución 5, evitando que las dos soluciones se entremezclaran y formando así dos fases claramente diferenciadas. La solución bifásica se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm y 4°C en una centrifuga Sorvall™ Biofuge primo R (Thermo Fisher Scientific) utilizando un rotor basculante (referencia: 75007591), tras lo cual se observó la banda de protoplastos generada en la interfase. Ésta fue recogida con una pipeta Pasteur estéril y transferida a otro tubo de 50 mL, donde se diluyó añadiendo Solución 6 en una relación de 2 volúmenes de Solución 6 por cada volumen de suspensión de protoplastos. Una segunda centrifugación en las mismas condiciones provocó la precipitación de los protoplastos, que fueron resuspendidos suavemente en 1 mL de solución 6 y transferidos a un tubo de 1.5 mL. Se lavaron mediante una centrifugación de 3 min a 4000 rpm, y finalmente se resuspendieron en la cantidad adecuada de solución 7 para obtener alrededor de 10^7 protoplastos/mL.

El proceso de transformación comenzó mezclando en un tubo de 50 mL, 50 µL de Solución 8, el volumen correspondiente de DNA para la transformación (X µL) completado con Solución

7 hasta los 50 μL (50-X μL), y el volumen de la suspensión de protoplastos equivalente a alrededor de $2 \cdot 10^6$ protoplastos. Tras 20 min a 0°C , se añadió 1 mL de Solución 8 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadieron 3-5 mL de Solución 7 y alrededor de 15 mL medio MMR-TOP (mismo procedimiento de preparación que el MMR únicamente cambia la concentración de agar que en este caso es 6 g/L de agar) precalentado a 50°C . Finalmente, se mezcló y se repartió todo el volumen sobre la superficie de 3 placas de MMR selectivo, es decir, placas sin el suplemento asociado al marcador de auxotrofia utilizado en la transformación. A modo de control, se siguió el mismo procedimiento con un tubo sin DNA. El volumen de este control fue dividido entre una placa de MMR selectivo (control negativo; ausencia de colonias) y una placa de MMR no-selectivo (conteniendo el suplemento asociado al marcador de selección utilizado). En esta última placa debía observarse un césped.

Cuando el DNA sintético no poseía marcador de selección se transformó con él una cepa en la que el gen diana había sido previamente reemplazado por *pyrG^{Af}* (ver siguiente sección). La selección de los transformantes deficientes en la biosíntesis de pirimidinas se realizó utilizando la sensibilidad que produce un alelo silvestre *pyrG* frente al compuesto ácido 5-fluororótico (5-FOA; Apollo Scientific). Así, las placas con medio selectivo contenían 2 mg/mL de 5-FOA y uridina/uracilo (ver Tabla 2.3), con el objetivo de permitir el crecimiento únicamente de aquellas colonias con fenotipo *pyrG⁻*, es decir, aquellas que supuestamente habían adquirido la construcción.

5.- Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

5.1. Construcción de mutantes nulos y etiquetado de genes de *A. nidulans*.

Los fragmentos lineales de DNA para la generación de mutantes nulos y etiquetado de genes se obtuvieron a través de la técnica de la PCR de fusión (Yang *et al.*, 2004), una técnica

estandarizada en el Laboratorio de Bioquímica II (Figura 2.1). En el primer caso, el fragmento sintético de DNA contenía el promotor (5'-UTR) y terminador (3'-UTR) del gen cuyo nulo se quería generar fusionados al marcador de auxotrofia. Para la construcción del etiquetado en el extremo C-terminal, el fragmento de DNA a transformar contenía la región 3' del ORF, el epítipo más el marcador de selección y, por último, el terminador (3'-UTR).

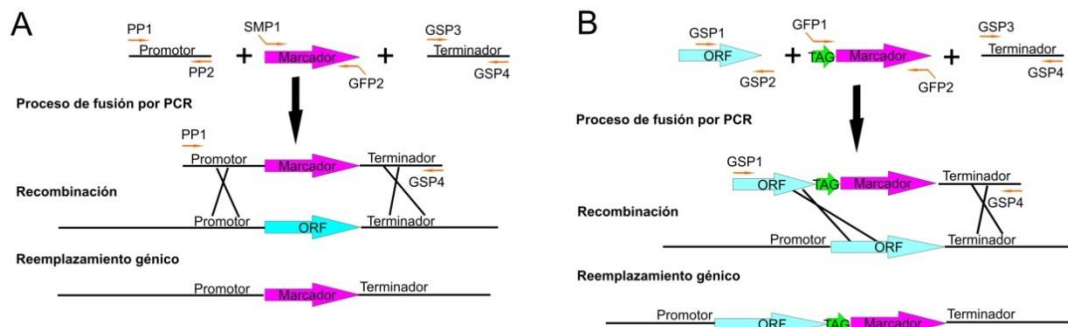


Figura 2.1. Esquema representativo de los procedimientos seguidos para la delección de genes y el etiquetado en el extremo C-terminal. A) Generación de mutantes nulos. Cada uno de los fragmentos a fusionar se amplificó por separado. Por un lado, el promotor y el terminador del gen que se quería deleccionar se amplificaron mediante los oligonucleótidos PP1/PP2 y GSP3/GSP4, respectivamente, y por otro lado, se amplificó el marcador de selección (en morado) mediante los oligonucleótidos SMP1/GFP2. Estos oligonucleótidos portaban, respectivamente, regiones complementarias al final del promotor y principio del terminador con los que posteriormente se fusionaría. El fragmento de fusión se generó utilizando los oligonucleótidos PP1/GSP4 y un doble suceso de recombinación homóloga en el *locus* diana permitió generar el alelo nulo, siendo el marcador de selección el que sustituyó el gen original (en azul). B) Etiquetado en C-terminal. Por un lado, se amplificaron aproximadamente 1.5 kb del extremo 3' del ORF (en azul) y el terminador del gen que se quería etiquetar mediante los oligonucleótidos GSP1/GSP2 y GSP3/GSP4, respectivamente, y por el otro lado, se amplificó el epítipo (TAG, en verde) junto con el marcador de selección (en morado) utilizando los oligonucleótidos GFP1/GFP2. Los siguientes pasos para la obtención del etiquetado en C-terminal fueron idénticos a los descritos para la generación del mutante nulo.

5.2. Mutagénesis dirigida de FlbB.

Para la generación de las cepas que expresaban las quimeras mutantes GFP::FlbB^(K67A; R68A), FlbB::GFP^(K67A; R68A) y *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB^(K67A; R68A) se utilizó un protocolo estandarizado de mutagénesis previamente descrito por (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). En primer lugar, utilizando como molde los plásmidos pBSK-*pyroA*^{*}::GFP::FlbB 1-426 (Figura 2.2A) o *pgpdA*^{mini}::GFP::FlbB

1-426-*pyroA4** (Figura 2.3), y los oligonucleótidos flbB-NLS(+1) y flbB-NLS(-1), se realizaron PCRs para introducir las mutaciones puntuales (K67A; R68A). Los oligonucleótidos, con una longitud de unos 30 pb cada uno y siendo complementarios entre sí, incluían las sustituciones nucleotídicas necesarias en su zona central.

Finalizada la reacción, se confirmó la amplificación del molde mediante electroforesis de agarosa. Debido a la presencia en el producto de PCR de plásmidos mutantes, parentales (sin mutación) e híbridos (una cadena mutante y la otra parental), éste se digirió con la enzima de restricción *DpnI*, la cual, digiere el DNA metilado y hemimetilado (moléculas de molde e híbridas). Ello permitió el aislamiento de los plásmidos mutantes, los cuales, fueron utilizados para transformar *E. coli*. Tras la extracción plasmídica de un grupo de colonias bacterianas se confirmó la presencia de las mutaciones requeridas mediante secuenciación. Estos plásmidos fueron utilizados para generar las cepas arriba descritas del modo expuesto en la Figura 2.2 y 2.3:

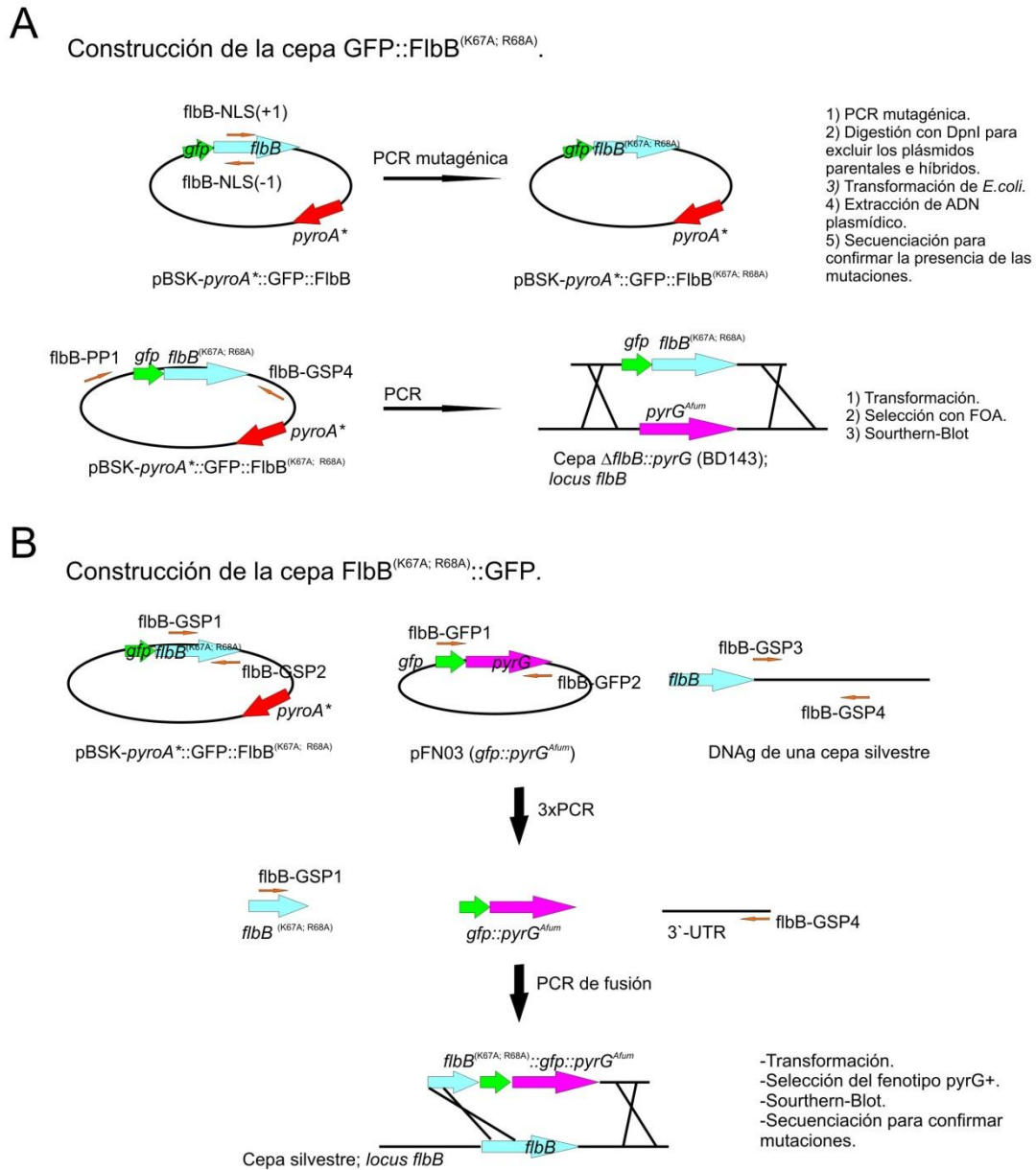


Figura 2.2. Procedimiento para la generación de los plásmidos y cepas que expresen bajo promotor nativo chimeras de GFP y FlbB con mutaciones puntuales en el dominio NLS. A) Construcción de la cepa GFP::FlbB^(K67A; R68A). Se generó a partir de la transformación del fragmento $flbB^D::gfp::flbB^{(K67A; R68A)}::3'-UTR$ en una cepa $\Delta flbB$. El fragmento fue amplificado a partir del plásmido pBSK-pyroA*::GFP::FlbB^(K67A; R68A) mediante los oligonucleótidos flbB-PP1 y flbB-GSP4. Debido a la falta de marcador genético, la selección de transformantes se realizó utilizando 5-FOA. B) Construcción de la cepa FlbB^(K67A; R68A)::GFP. Se generó a partir de la transformación con el fragmento $flbB^{(K67A; R68A)}::gfp::pyrG^{Afum}::3'-UTR$, previamente construido mediante la fusión de los siguientes tres fragmentos (i) uno de 1.5kb con la región 3' del gen, amplificado con los oligonucleótidos flbB-GSP1 y flbB-GSP2 a partir del plásmido mutante pBSK-pyroA*::GFP::FlbB^(K67A; R68A); (ii) $gfp::pyrG^{Afum}$ (oligonucleótidos flbB-GFP1 y flbB-GFP2) y (iii) la región 3'-UTR de $flbB$ (oligonucleótidos flbB-GSP3 y flbB-GSP4) (Yang *et al.*, 2004).

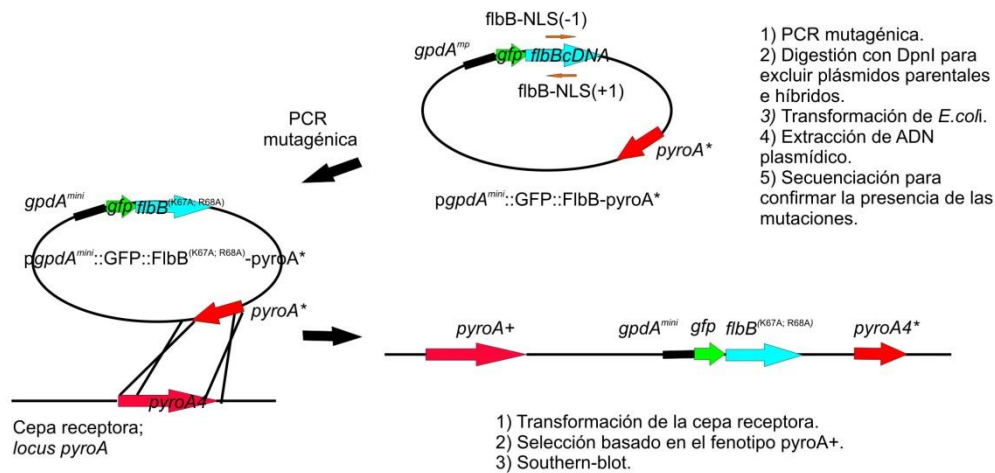


Figura 2.3. Construcción de la cepa *gpdA^{mini}::GFP::flbB^(K67A;R68A)*. La cepa expresando la químera *GFP::flbB^(K67A;R68A)* bajo promotor *gpdA^{mini}* se generó a partir de la recombinación del plásmido mutante correspondiente en el *locus pyroA* de la cepa BD177 ($\Delta flbB$).

5.3. Extracción de DNA genómico de *A. nidulans*.

La extracción de DNA se realizó siguiendo el método estandarizado descrito por (Herrero-García, 2013). Primero se prepararon matraces Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de MMA suplementado con los nutrientes adecuados. El medio fue inoculado con una concentración final de 10^6 conidios/mL, e incubado a 37°C y 250 rpm durante 15 h. Tras ello, el micelio de cada cultivo se recolectó mediante filtración (Miracloth), y se liofilizó durante 15-18 h (Cryodos; Telstar). Cada muestra de micelio liofilizado se pulverizó con una bola de acero inoxidable de 3.2 mm de diámetro (Next Advance) mediante un pulso de un minuto en el homogenizador (Mini-Beadbeater; Biospec).

El micelio pulverizado fue resuspendido en 1 mL de solución de lisis (25 mM Tris-HCl pH = 8.0, 0.25 M sacarosa y 20 mM EDTA). La suspensión se homogeneizó, se añadieron 100 μ L de SDS 10% y el extracto fúngico se incubó durante 15 min a 65°C. Posteriormente, se le añadió 1 mL de la mezcla fenol/SEVAG (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)) y se agitó vigorosamente durante 10 min para así eliminar proteínas y otros compuestos orgánicos. En

ese momento, una centrifugación durante 5 min a 13 000 rpm permitió la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa (fase superior) fue recogida y sometida nuevamente al mismo proceso con la mezcla fenol/SEVAG. En la nueva fase acuosa recogida, el gDNA se precipitó añadiendo 0.1 y 0.6 volúmenes de acetato sódico (3 M, pH = 6.0) e isopropanol, respectivamente. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min para sedimentar el gDNA precipitado. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 80% y tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se secó y se resuspendió en 300-500 µL de agua milli-Q autoclavada. Para eliminar la posible contaminación de RNA, cada muestra se incubó con 5 mg/mL de RNasa-A (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 60 min y después, el gDNA se precipitó nuevamente con acetato sódico e isopropanol. Tras lavar nuevamente el gDNA sedimentado con 0.5 mL de una solución de etanol al 80% y secarlo, se resuspendió en 100-200 µL de agua milli-Q, almacenándolo a -20°C hasta su utilización.

5.4. Extracción de RNA total de *A. nidulans* para experimentos de Northern-blot.

Para la extracción de RNA total se utilizó el protocolo estándar del Laboratorio de Bioquímica II (Garzia, 2011). Las muestras cultivadas como se describe en el apartado 2 de este capítulo se congelaron y pulverizaron en mortero con nitrógeno líquido, evitando en todo momento su descongelación. Aproximadamente 150-200 mg de cada muestra pulverizada se transfirió a un tubo de 2 mL y se añadió 1 mL de solución TriReagent (Sigma-Aldrich) por tubo, humedeciendo toda la muestra. Después, las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente, invirtiéndolas periódicamente. Se añadieron 0.2 mL de cloroformo por tubo y se dejaron reposar 3 min de nuevo a temperatura ambiente. Una vez concluido este periodo, las muestras se centrifugaron a 12 000 g y 4°C durante 15 min y se transfirieron las fases acuosas correspondientes a tubos nuevos de 2 mL, repitiéndose el proceso una segunda vez con 0.75 mL de solución TriReagent. Tras transferir la nueva fase acuosa a tubos de 2 mL, se añadieron

0.5 mL de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Su centrifugación a 12 000 g, durante 10 min a 4°C, precipitó el RNA. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1mL de una solución al 75% (v/v) de etanol/agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich) libre de RNasas. Se centrifugaron las muestras a 7500 g, durante 5 min a 4°C, y se volvió a eliminar el sobrenadante con vacío. Finalmente, se disolvieron las muestras en 80-150 µL de agua tratada con DEPC y se incubó durante 10-15 min a 55-60°C para disolver bien el precipitado. La medida de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c_Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) permitió calcular la concentración de RNA total extraído de cada muestra, mientras que se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la integridad de las muestras de RNA.

5.5. Experimentos de Southern-blot.

El método que se describe a continuación (Garzia, 2011), en el que se utiliza el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), fue modificado a partir del descrito por (Sambrook *et al.*, 1989). El gDNA fue digerido con la enzima de restricción escogida y los diferentes productos de la digestión separados en un gel de agarosa (0.8% p/v). Tras ello, se expuso el gel bajo radiación UV (312 nm; TFX-20.M; Vilber Lourmat) durante 10 min. Después, se desnaturalizó el DNA durante 45 min en solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) y neutralizó mediante dos baños de 30min en solución neutralizante (0.5 M Tris, 3 M NaCl, ajustado a pH = 7.5 con HCl). La desnaturalización permite que posteriormente las hebras de gDNA generen híbridos con la sonda. Se lavó el gel con solución 2xSSC (SSC 20X: 3 M NaCl y 300 mM citrato trisódico, ajustado a pH = 7.0 con HCl) y finalmente se realizó la transferencia del DNA a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche). Para ello se siguió el protocolo estandarizado de transferencia por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando la solución de transferencia SSC (20X).

Se fijó el DNA a la membrana tras dos exposiciones de 120 mJ a 254 nm (BLX-E254; Vilber Lourmat) y ésta se introdujo en un tubo de hibridación (Labnet). La pre-hibridación se realizó en solución Church a 42°C (para 200 mL: 2 g BSA, 400 µL EDTA 0.5 M, 70 mL SDS 20%, 30 mL H₂O, 100 mL (Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄) 1 M pH7) (Church y Gilbert, 1984) y durante 2 h, para posteriormente proceder con la hibridación de una sonda específica de DNA marcada con digoxigenina-dUTP. Para la generación de la sonda, se utilizó alrededor de 1 µg de DNA diluido en 16 µL. Primero fue desnaturalizado a 95°C durante 10min y se dejó enfriar en hielo 5 min. Tras ello, se añadieron 4 µL de solución DIG-High Prime (Roche) y se incubó la mezcla a 37°C durante aproximadamente 16h. La reacción fue inactivada añadiendo 2 µL de EDTA (0.2 M; pH = 8.0) y calentando a 65°C durante 10 min. Finalmente, 5 µL de la mezcla de la sonda fueron desnaturalizados a 95°C durante 5min y enfriados 1 min en hielo antes de añadirlos al tubo de hibridación. La hibridación con la sonda se realizó durante toda la noche a 42°C.

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación se efectuaron dos baños de 5 min a temperatura ambiente en SSC 2x y SDS 0.1%, seguidos de otros dos de 15 min a 65°C en SSC 0.5x y SDS 0.1%. Finalmente, la membrana se lavó durante 5min en una solución de lavado (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl y 0.3% tween 20 (Acros Organics), ajustada a pH = 7.5 con NaOH). Realizados los lavados, la membrana se incubó 30 min en solución bloqueante (stock 10x en el kit de Roche diluido en una solución de ácido maléico: 0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl y ajustada a pH = 7.5 con NaOH). Se repitió la incubación pero, en este caso, añadiendo anti-digoxigenina (75 mU/mL) a un volumen total de 20 mL de solución bloqueante (1x) para detectar los nucleótidos de la sonda marcados con la molécula esteroide DIG. Se limpió nuevamente durante 15 min dos veces en una solución de lavado y, tras ello, se equilibró la membrana durante 5min en solución de detección, compuesta por Trizma base (0.1 M, Sigma-Aldrich) y NaCl (0.1 M), y ajustada a pH = 9.5 con HCl.

Para inducir la reacción luminiscente, la membrana se puso en contacto con el reactivo CSPD (Roche) durante 5 min, seguido de una incubación durante 10min a 37°C. Finalmente, se expuso la membrana para obtener los resultados (Chemidoc; Bio-Rad).

5.6. Experimentos de Northern-blot.

Se siguió el método descrito por (Garzia, 2011). Las muestras de RNA se separaron realizando una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa (1.2%)/formaldehído. Para la preparación de un gel de 200 mL se fundieron 2.4 g de agarosa en 144 mL de agua tratada con DEPC, y se añadieron a continuación 20 mL de MOPS 10x (0.4 M MOPS, Sigma-Aldrich; 0.1 M acetato sódico; 0.01 M EDTA). Finalmente, cuando la temperatura de la solución había bajado a 42-48°C, se añadieron 36 mL de formaldehído (36,5-38%, Sigma-Aldrich), dejando solidificar el gel.

Las muestras se prepararon añadiendo el volumen correspondiente a 7 µg de RNA total (XµL) (apartado 5.4), completado hasta los 10 µL con agua tratada con DEPC, a una mezcla con 12.5 µL de N,N-dimetil formamida, 4 µL de formaldehído (36,5-38%), y 2.5 µL de MOPS (10x). Tras incubar las mezclas durante 10 min a 60°C, se les añadió tampón de carga, se cargaron en el gel y éste se resolvió a 10-30 V en solución MOPS (1x) durante 15-16 h. El gel se tiñó en bromuro de etidio para comprobar la calidad y la cantidad relativa de cada muestra de RNA, y después de desteñirlo con baños de agua, se efectuó la transferencia siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.5. Tras la transferencia, se enjuagó la membrana 5 min en SSC 2x, se secó sobre papel de filtro, y se fijó mediante exposición bajo luz ultravioleta (tres exposiciones de 120 mJ a 254 nm). Posteriormente, se mantuvo 2 h a 80°C.

La sonda de DNA fue marcada con dCTP, la cual incorporaba el isótopo radioactivo α -P³². Para ello se utilizó el Random Primed DNA Labeling Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana se incubó 16 h a 55°C con la sonda radioactiva y para retirar los restos de sonda no hibridada se realizaron diferentes lavados. En primer lugar, dos lavados a

temperatura ambiente con una solución con 2x SSC y 0.1% SDS y, posteriormente, dos lavados a 55°C con una solución con 0.2x SSC y 0.1% SDS. Después de los lavados se monitorizó la señal radioactiva del filtro con un contador Geiger y se detectó con una pantalla BAS-MS (Fujifilm) utilizando un equipo Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes se procesaron y analizaron con los programas informáticos Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) o Image J, este último de libre acceso (<http://imagej.nih.gov/ij>; U. S. National Institutes of Health). Debido a la imposibilidad de trabajar con muestras radioactivas en la Facultad de Ciencias Químicas de la UPV/EHU, las hibridaciones y revelados los realizó el Dr. Eduardo A. Espeso (CIB-CSIC).

5.7. RT-qPCR.

Las muestras de RNA total de tres réplicas biológicas independientes se trataron con DNAsa I libre de RNAsas y se purificaron utilizando el kit RNeasy Mini de Qiagen. El cDNA fue sintetizado utilizando el kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies), según las instrucciones del fabricante y efectuándose una reacción sin la retro-transcriptasa (RT) como control para cada muestra de RNA (control RT-). La reacción qPCR de cada cDNA fue realizada por triplicado, al igual que en el caso de los controles RT- y las reacciones control sin el cDNA (controles NTC, del inglés, *no template controls*).

Las sondas y oligonucleótidos se diseñaron específicamente para el estudio mediante qPCR de la expresión de cada gen (Tabla 2.2) (IDT primers and ZEN double quenched probes; IDT, <http://eu.idtdna.com/site>), basándose para ello en los resultados del experimento de RNA-seq y la secuenciación de los cDNAs correspondientes a los genes *An7895*, *An7896* y *An7901*. Antes de utilizarlas en el estudio, se verificó la eficiencia de cada conjunto de sonda y oligonucleótidos con la realización una curva patrón (no mostrado).

Las reacciones qPCR se realizaron en un equipo ABI 7900 HT system (Applied Biosystems) añadiendo a cada pocillo 5 µL de la mezcla 2x Brilliant II QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 20 ng de cDNA, 500 nM de los oligonucleótidos y 250 nM de la sonda, todo ello

para un volumen total por reacción de 10 μ L. Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: un paso inicial a 95°C durante 2 min, 40 ciclos de 20 s a 95°C y un paso final durante 1 min a 60°C. Los niveles de transcripción fueron expresados en valores Δ ct ($Ct_{gen} - Ct_{referencia}$), los cuales representan la expresión de cada gen de interés corregido con la expresión de los genes endógenos de referencia (*actA*; *mipA*) (Tabla 2.2).

6.- Técnicas de biología molecular para *E. coli*.

6.1. Condiciones y medio de cultivo.

E. coli se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), el cual, está compuesto por Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L (pH = 7.5, ajustado con NaOH y esterilizado por autoclave). En caso de medio sólido se añadió agar 1.5% (p/v). Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, el antibiótico (en forma de sal sódica) se añadió en una concentración final de 100 μ g/mL mientras que en caso de selección de recombinantes por ausencia de actividad β -galactosidasa, se añadieron al medio, además de ampicilina, X-gal e IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) en una concentración final de 83 mM y 0.1 mM, respectivamente.

6.2. Transformación de *E. coli*.

La transformación de células competentes de las cepas *DH1* y *DH5 α* de *E. coli* se realizó utilizando la técnica del shock térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello, se mezclaron 100 μ L de células competentes con la cantidad adecuada de DNA en un tubo de 1.5 mL. La mezcla se mantuvo en hielo durante 15min, se incubó posteriormente a 37°C durante 2 min y se volvió a dejar en hielo durante 1 min. Tras añadir 1 mL de medio LB líquido al tubo, la mezcla se incubó a 37°C y 250 rpm durante 1 h y, finalmente, volúmenes variables de la mezcla de transformación fueron inoculados sobre medio LB sólido suplementado con ampicilina.

6.3. Extracción de DNA plasmídico.

Las colonias bacterianas seleccionadas fueron inoculadas en 10 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina y se cultivaron a 37°C y 250 rpm durante 15 h. La extracción del DNA plasmídico se realizó mediante el kit GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich) y la correcta extracción fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8% p/v) en solución TAE (1x).

6.4. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

La expresión se llevó a cabo utilizando el protocolo estandarizado descrito por (Garzia, 2011), con algunas modificaciones. Primero, la cepa *DH1* fue transformada con el plásmido adecuado. Tras ello, la bacteria se cultivó en 10 mL de medio LB con ampicilina a 37°C durante 16 h (200 rpm) y después, se diluyó 1 mL del cultivo en un volumen final de 50 mL del mismo medio selectivo. La dilución se incubó a 37°C hasta que alcanzó una $OD_{600} = 0.5-0.8$. Entonces se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó durante 24 h a 15°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm y 4°C durante 10 min, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 15 mL de PBS (de las siglas en inglés: *phosphate-buffered saline*, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM K_2HPO_4 , ajustada a pH = 7.3) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasa (Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Las células fueron lisadas mediante sonicación (Labsonic P.; B. Braun Biotech), realizando 12 pulsos de 30 s a una amplitud del 95%. Finalmente, las mezclas se centrifugaron a 14 000 rpm y 4°C durante 25 min para recoger cada sobrenadante. La presencia de la fusión deseada en el sobrenadante se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie Bio-safe (Bio-Rad) de las muestras recogidas durante todo el proceso.

7.- Aislamiento y manipulación de proteínas de *A. nidulans*.

7.1. Extracción de proteína total.

Los extractos proteicos de *A. nidulans* se obtuvieron utilizando dos protocolos distintos, ambos adaptados a partir de los descritos por (Herrero-Garcia, 2013). El primero de ellos (método 1) es válido únicamente para la detección de proteínas por *Western-blot* mientras que el segundo (método 2) permite obtener extractos que pueden ser utilizados en ensayos de retención de proteína (*pull-down*). En ambos procedimientos se partió de cultivos en medio MFA líquido (10^6 conidios/mL) cultivados a 37°C durante 16h. El micelio filtrado se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y finalmente, se pulverizó a 4°C mediante dos pulsos de 4 s en el homogeneizador de muestras.

Método 1:

Aproximadamente 6-7 mg de micelio pulverizado de cada muestra fueron resuspendidos en 1 mL de tampón de lisis (0.2 M NaOH y 0.2% β -mercaptoetanol en H₂O). Las proteínas se precipitaron añadiendo ácido tricloroacético (TCA) en una concentración final del 7.5% (v/v) y posterior incubación en hielo durante 10 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaron dos veces a 14 000 rpm y 4°C durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Sobre el precipitado se añadieron 100 μ L de Tris Base (1 M) y 200 μ L de Tampón de Ruptura (62.5 mM Tris-HCl pH = 6.8, 2% SDS (p/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea, 0.05% azul de bromofenol (p/v)), y la suspensión se homogeneizó con agitación por vortex. Antes de cargarlas en un gel de SDS-poliacrilamida, las muestras se hirvieron durante 2 min a 90°C y se centrifugaron 1 min a 13 000 rpm.

Método 2:

200-250 mg de micelio filtrado fueron liofilizados, pulverizados, resuspendidos en 1 mL de tampón A50 (25 mM HEPES, pH 7.5; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% Glicerol;

0.5 mM 1,4-ditiotreitol (DTT); cocktail de inhibidores de proteasas, (Roche)) e incubados durante 90 min a 4°C mezclándose continuamente por inversión en un agitador tipo noria. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron 30 min a 14 000 rpm y 4°C, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Aunque una parte de este extracto proteico de *A. nidulans* se precipitó (ver párrafo siguiente), el resto se guardó a -80°C para su manipulación en posteriores experimentos.

Para los ensayos de *Western-blot* se precipitaron 100 µg de proteína añadiendo TCA en una concentración final del 10% (v/v) e incubando la mezcla en hielo durante 10min. Las proteínas se sedimentaron centrifugando 5 min a 14 000 rpm y 4°C, y se lavaron sucesivamente con dos mezclas Etanol/Eter 1:1 y 1:3, respectivamente, centrifugando tras cada lavado a 14 000 rpm, 5 min y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por vacío. Finalmente, cada precipitado de proteínas se secó por evaporación del remanente de solución de lavado y se resuspendió en 40 µL de tampón de ruptura. Los extractos proteicos desnaturalizados se calentaron a 95°C durante 5 min, como paso previo a su carga y análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

7.2. Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de *Western-blot*.

El protocolo de inmunodetección utilizado en este trabajo se basa en el descrito por (Herrero-Garcia, 2013). La separación de los extractos proteicos se realizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10% (p/v) (sistema MiniProtean 3 de Bio-Rad) (Laemmli, 1970). Cada muestra se cargó en dos geles diferentes. Uno de ellos se tiñó con la tinción Biosafe Coomasie (Bio-Rad) para visualizar las bandas correspondientes a cada proteína o grupo de éstas con la misma movilidad electroforética. El contenido del segundo gel fue transferido a una membrana de PVDF para proceder con la

detección del antígeno o epítopo requerido. Los anticuerpos primarios utilizados fueron el monoclonal de ratón anti-GFP de Roche (1:1000), anti-actina fúngica de ICN Biomedical generado en ratón (1:5000), anti-HXQ de conejo (1:80000) (Chemicon) o el monoclonal de ratón anti-HA de Santa Cruz (1:1000). Como anticuerpos secundarios, conjugados a la peroxidasa de rábano, se utilizaron sueros de cabra contra inmunoglobulinas IgG de ratón (1:2500) (Jackson) o conejo (1:10000) (Sigma-Aldrich), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La reacción quimioluminiscente se activó mediante Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad) y la imagen de la reacción quimioluminiscente se capturó con el dispositivo Chemidoc+XRS system (Bio-Rad). También se utilizaron los programas Image Lab (Bio-Rad) e Image J, de libre acceso, para analizar las imágenes.

8.- Ensayos de retención de proteínas mediante la técnica de *pull-down*.

Los experimentos de retención de proteína (*pull-down*) se realizaron utilizando quimeras de GST y FlbB expresadas en *E. coli* y extractos proteicos totales de *A. nidulans* obtenidos a través del método de extracción número 2 descrito en la sección 7.1. Primero, la proteína de fusión de la fracción soluble del extracto de *E. coli* fue añadida a la resina de glutatión-sefarosa (GE Healthcare) que previamente fue lavada dos veces con disolución PBS incluyendo inhibidores de proteasas. Las centrifugaciones de los lavados se realizaron a 5000 rpm, 2 min a 4°C. La mezcla se incubó durante 1 h a 4°C en un agitador rotador y posteriormente, la resina con la proteína GST unida se lavó con PBS conteniendo tritón al 1% (v/v). Este proceso sirvió para retirar las proteínas de *E. coli* que pudieran haberse quedado atrapadas inespecíficamente en la resina. Después, se añadieron 2mg del extracto proteico de la cepa de *A. nidulans* que expresaba la proteína etiquetada de interés y se incubó durante 40 min a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo, la resina que contenía los posibles complejos de interacción fue lavada con PBS con tritón 1%, (v/v) para finalmente resuspenderla en tampón

de ruptura (62.5 mM Tris-HCl pH = 6.8, 2% SDS (p/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea, 0.05% (p/v) azul de bromofenol). La muestra se analizó en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida con tinción Coomasie, y *Western-blot* (ver apartado 7.2) para determinar la capacidad de la proteína de fusión de *E. coli* para retener la proteína de *A. nidulans* de interés.

9.- Co-cultivos de *A. nidulans* y *Micrococcus luteus*.

Se prepararon y cultivaron mezclas con diferentes concentraciones relativas de conidios de *A. nidulans* y células de *M. luteus*, a las cuales se denominó co-cultivos según el término utilizado por (Schroeckh *et al.*, 2009) (ver Figura 2.4). Dichos co-cultivos se prepararon a partir de dos disoluciones pre-incubadas independientemente. Los conidios de las cepas de *A. nidulans* (10^7 esp/mL) fueron incubados en MMA-nitrato a 37°C y a 200 rpm durante 4 h y las células de bacteria (10^8 células/mL) fueron incubadas en LB a 30°C y a 200 rpm durante una hora. Se utilizó nitrato como fuente de nitrógeno de los pre-cultivos de *A. nidulans* con la intención de reproducir las condiciones de cultivo utilizadas por (Gerke *et al.*, 2012). Después, los conidios se diluyeron en tubos de 1.5 mL a 10^6 conidios por mililitro, y se añadieron concentraciones crecientes de células bacterianas a cada tubo (0, 10^7 , 2.5×10^7 y 5.0×10^7 células/mL), en un volumen total de 0.5mL. También se prepararon tubos control utilizando el mismo rango de concentraciones de células bacterianas, pero sin la adición de conidios. Finalmente, 10 μ L de cada mezcla (2.0×10^4 conidios) fueron inoculados en el centro de placas LB adecuadamente suplementadas con los nutrientes asociados a las auxotrofías de las cepas de *A. nidulans* utilizadas. Las fotografías de las placas se tomaron después de 48 h de cultivo a 37°C. Tras ello, una muestra circular de 0.60 cm de la zona de co-cultivo (zona central) fue diseccionada de cada placa. Las células de cada muestra se resuspendieron en 2.5 mL de medio LB mediante agitación por vortex y las células bacterianas se cuantificaron utilizando un hemocitómetro. Todos los resultados corresponden a la media y el error estándar de la media (*sem*) de tres réplicas biológicas y nueve réplicas técnicas por cepa.

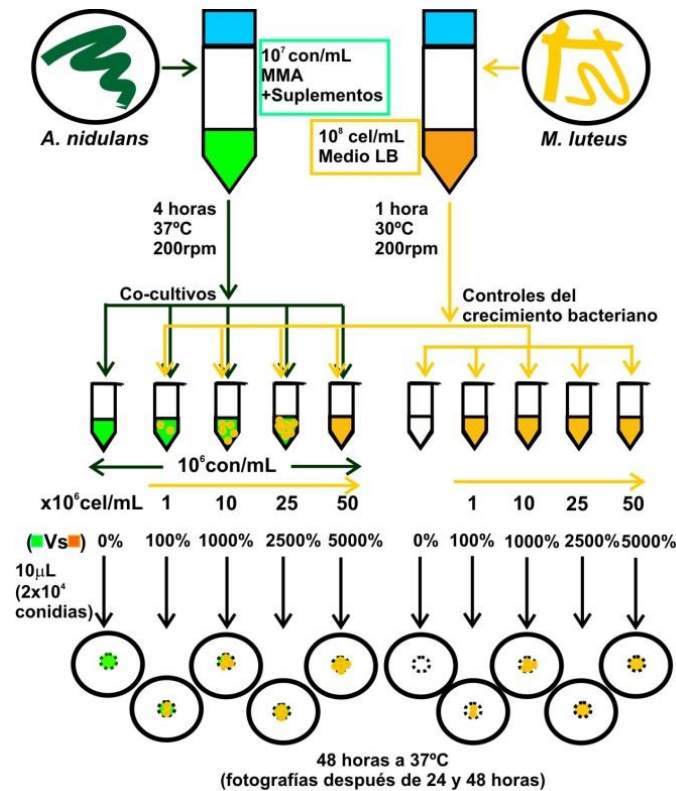


Figura 2.4. Diseño experimental para los co-cultivos de conidios de *A. nidulans* y células de *M. luteus*. Tras el cultivo independiente de *A. nidulans* (10^7 esp/mL) y *M. luteus* (10^8 células/mL) en 10 mL de MMA-nitrato y LB, respectivamente, se combinaron distintas concentraciones relativas de ambos tipos celulares en un volumen total de 0.5 mL y se inocularon 10 µL de cada mezcla en placas LB suplementadas con los nutrientes requeridos por las cepas de *A. nidulans* utilizadas.

10.- Análisis de la localización subcelular de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.

Los análisis de localización subcelular de proteínas mediante microscopía de fluorescencia se realizaron utilizando los siguientes microscopios: (1) Un microscopio invertido DMI6000B (Leica) equipado con un filtro TX2 (excitación, 562 nm; emisión, 624 nm; Leica) para la detección de mCh o mRFP y un filtro GFP-3035B (excitación, 470 nm; emisión, 525 nm; Semrock Brighline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP, una lámpara externa EL6000 para la excitación de epifluorescencia y un objetivo HCX 63x 1.4N.A.; o (2) un microscopio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una lente de inmersión en aceite 63x Plan-Apochromat 1.4 y los filtros número 38 (Fluorescencia verde: excitación, 470 nm;

emisión, 525 nm) y 43 (fluorescencia roja: excitación, 545 nm; emisión, 605 nm). En ambos casos se utilizaron placas de 8 pocillos (Cat. No. 80821; Ibidi), inoculando las conidiosporas en 300 μ L de WMM por pocillo (Penalva, 2005) (ver Tabla 2.4) e incubando a 25°C durante 18 h.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de genes con el promotor *alcA* se utilizaron distintas fuentes de carbono. Por un lado, para la inducción con etanol, se cultivó *A. nidulans* en un medio con etanol (1%) más glucosa (0.05% p/v) durante 18 h a 25°C y por otro lado, para la inducción con treonina, primero se cultivó durante 18 h en medio con glucosa (0.1% p/v) para cambiar tras ello a un medio con treonina (100 mM). Los resultados obtenidos en medio inductor se compararon siempre con los obtenidos con un control que contenía glucosa (medio represor).

La dependencia del transporte de proteínas específicas con respecto a los MMTT se analizó sustituyendo el medio de cultivo por medio fresco con Benomilo (3 μ g/mL; Sigma-Aldrich). Transcurridos 5 min se comenzó a tomar fotografías y tras ello, se retiró el medio para añadir nuevamente medio fresco que permitiera analizar si el transporte de la proteína estudiada era recuperado tras la eliminación de la droga.

Finalmente, para el análisis de la localización subcelular de proteínas durante el desarrollo de conidióforos, se inocularon placas de Petri (Cat. No. 81151; Ibidi) con medio mínimo sólido fundido. Una vez solidificado, se retiró parte del medio sólido y se inocularon esporas de la cepa a analizar en la conjunción entre la base de la placa y el medio sólido. Tras la incubación durante 16-24 h a 37°C, se añadió medio líquido sin fuente de nitrógeno (para mantener las condiciones inductoras), precalentado a 37°C, a la zona de la placa vacía y se analizó la muestra.

El programa de libre acceso ImageJ fue el utilizado para la visualización, procesamiento y cuantificación de la fluorescencia de las imágenes. Las gráficas bidimensionales (intensidad de la fluorescencia respecto a longitud del segmento analizado) permitieron cuantificar la

fluorescencia de la punta y el primer núcleo de cada hifa con el objetivo de calcular las relaciones de fluorescencia entre estas dos regiones. La cuantificación de la fluorescencia se realizó en al menos de 10 hifas de cada cepa y la significancia estadística entre diferentes cepas se evaluó mediante la función prueba t (dos colas) (Office Excel, Microsoft).

11.- Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias genómicas y proteicas: alineamientos y conservación.

Las secuencias para el diseño de experimentos de biología molecular utilizando el programa Vector NTI (Invitrogen) se obtuvieron a partir de las bases de datos del instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html) y del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (<http://www.aspergillusgenome.org/>). Las sintenia o alineamiento de las regiones genómicas equivalentes de diferentes especies también se realizaron utilizando la primera base de datos. Las búsquedas de similitud entre las proteínas, sin embargo, se efectuaron en el portal ExPASy (<http://expasy.org>) con el algoritmo BLAST.

Para comparar dos secuencias de nucleótidos se realizaron alineamientos con el programa Lalign (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html). Por otro lado, los alineamientos de secuencias proteicas fueron realizados con el software ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) y visualizados con el programa GeneDoc (versión 2.6.003; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el programa MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

12.- Secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).

La recogida de muestras, con dos réplicas biológicas por cepa y condición, y la extracción del RNA total, fueron realizadas por el Dr. A. Garzia (actualmente en la universidad

Rockefeller, Nueva York, EEUU) mientras que el procesamiento de los datos (demultiplexado, mapeo, expresión diferencial y análisis de ontología génica, ver secciones siguientes) fue realizado por LifeSequencing S.L y confirmado posteriormente por el propio Dr. Garzia. A continuación se explica brevemente el procedimiento seguido.

12.1. Aislamiento de RNA, construcción de la librería de mRNA, y secuenciación Illumina.

La extracción del RNA total se realizó utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y siguiendo el protocolo de Invitrogen (Invitrogen) (Garzia *et al.*, 2013). Las muestras se purificaron con el kit RNeasy Mini (QIAGEN). Posteriormente, la correcta concentración e integridad del RNA total fueron comprobadas mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), respectivamente. Cada muestra de RNA total (20-50 µg) fue tratada con DNasa y enriquecida en RNA mensajero (mRNA) utilizando etiquetas oligo(dT), de acuerdo con el protocolo estándar de Illumina (Illumina). Las muestras de RNA con poly(A) (0.2–1µg) fueron divididas en fragmentos más pequeños (200–500bp; la media de todas la librerías es aproximadamente de 280 pb) y fueron utilizadas para sintetizar la librería de cDNA. La secuenciación se realizó con el método *pair-end-read*, modo 2x 76-base, en un secuenciador GAIIx (Illumina), corriendo cuatro muestras por calle (multiplexing).

12.2. Demultiplexado, mapeo respecto al genoma de referencia y cuantificación de los datos de secuenciación.

El demultiplexado de las secuencias se realizó utilizando un software de libre acceso que fue descargado del enlace <http://brianknaus.com/>. La calidad de las lecturas se verificó mediante el programa fastQC, seleccionando aquellas con valores por encima de Q30. El mapeo se ejecutó con la versión 2.0.9 del software TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>), de acceso libre, siguiendo los pasos del protocolo desarrollado por (Trapnell *et al.*, 2012). La versión s07-m02-r07 del genoma anotado de *A. nidulans* (<http://www.aspergillusgenome.org/>)

fue empleada como referencia (archivo gtp) para mapear los resultados del RNA-seq (archivos en formato FASTAQ).

La versión 2.1.1 de Cufflinks (Cuffdiff) fue utilizada para la estimación de la abundancia de los transcritos y el análisis de las diferencias de expresión génica. Los valores cuantitativos y normalizados de las lecturas de cada gen se proporcionaron según el número de fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM por sus siglas en inglés) que mapearon en él. Para determinar la significancia en la diferencia de expresión de un gen específico en dos fondos genéticos, Cuffdiff calculó el valor p (el valor p no corregido del test t) y el valor q (el valor p-ajustado mediante el FDR) (FDR, de las siglas en inglés: *false-discovery-rate*). La significancia depende de si p es mayor que la tasa FDR después de una corrección Benjamini-Hochberg (Benjamini *et al.*, 2001) para múltiples pruebas. En este caso, los valores de q entre 0 y 0.05 indican cambios significativos. Las representaciones gráficas de los resultados se generaron mediante el programa cummeRbund.

12.3. Análisis de Ontología génica (GO).

EL análisis GO se realizó utilizando el paquete topGO del *Bioconductor project* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>). Para identificar términos GO de los grupos de genes diferencialmente expresados, se obtuvieron las anotaciones de *A. nidulans* desde la base de datos AspGD ([http://www.aspgd.org/download/go/gene association.aspgd.gz](http://www.aspgd.org/download/go/gene%20association.aspgd.gz)).

**Modificaciones en el perfil de
expresión génica de *A. nidulans*
causadas por la ausencia del factor
de transcripción FlbB.**

1.- Introducción.

El gen *flbB* codifica un FT que activa la conidiación a través de la unión directa al promotor de *brlA* (ver sección 4.3.2 en la Introducción). Sin embargo, se desconoce si puede desempeñar alguna función sobre otras rutas. Con la intención de disponer de una visión general de los procesos celulares alterados en ausencia de actividad FlbB, se decidió realizar un análisis transcriptómico masivo. Así, se utilizó la secuenciación de RNA o RNA-seq (Garzia *et al.*, 2013; Mortazavi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011) para secuenciar y comparar los transcriptomas de una cepa nula en el gen *flbB* y su cepa isogénica silvestre (WT).

Antes de la secuenciación, y con el objetivo de seleccionar las fases del desarrollo adecuadas para los análisis, se realizó mediante la técnica de *Northern-blot* un estudio horario de la expresión de genes UDA (*flbB*, *flbD*, *flbC* y *fluG*) y CDP (*brlA*, *abaA* y *wetA*) durante el crecimiento vegetativo (18–24 h) y el desarrollo asexual (1-13 h después de la inducción) (Figura 3.1). Los resultados mostraron la máxima expresión de los genes UDA tras 18-19 h de crecimiento vegetativo (rectángulo amarillo en Figura 3.1) y 4-5 h después de la inducción de la conidiación (rectángulo rojo en la Figura 3.1). Este segundo pico de expresión UDA precedía a la activación de los genes CDP (rectángulo azul en Figura 3.1).

Considerando la presencia de dos picos de expresión UDA, se decidió realizar dos comparaciones transcriptómicas. La primera comparación transcriptómica entre la cepa $\Delta flbB$ y su cepa isogénica silvestre se realizó tras 19 h de cultivo en MMA líquido (VG, de las siglas en inglés: *vegetative growth*), mientras que la segunda comparó los transcriptomas de las mismas cepas 5 h después de filtrar el micelio y depositarlo en MMA sólido. Corresponde, por lo tanto, a fases tempranas de la conidiación (AD, de las siglas en inglés: *asexual development*). Debe tenerse en cuenta que en este segundo punto de análisis, las muestras recogidas compararon

el perfil de expresión de una cepa silvestre, la cual es capaz generar esporas asexuales, con el de una cepa ($\Delta flbB$) incapaz de iniciar el programa de desarrollo asexual.

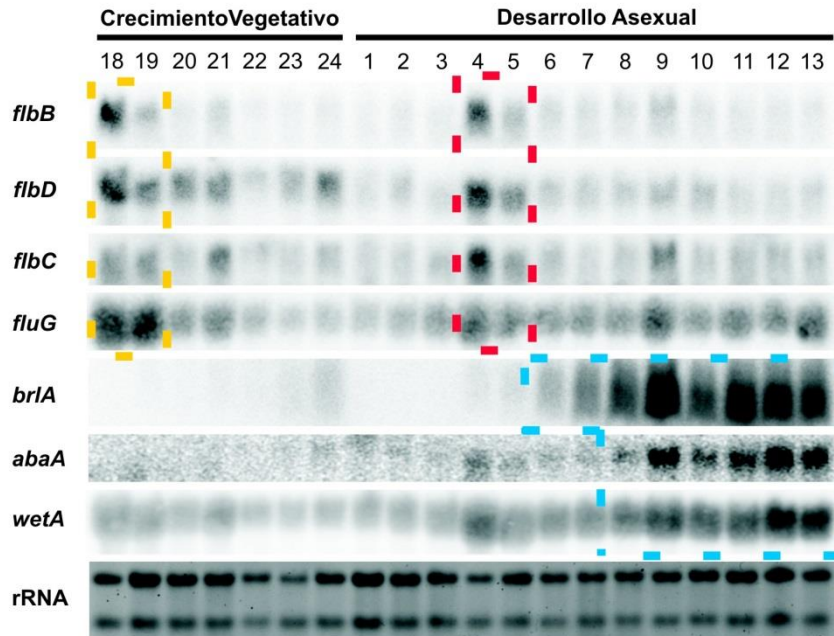


Figura 3.1. Análisis horario mediante la técnica de *Northern-blot* de la expresión de genes UDA (*flbB*, *flbD*, *flbC* y *fluG*) y CDP (*briA*, *abaA* y *wetA*) durante el crecimiento vegetativo (18-24 h) y el desarrollo asexual (1-13 h después de la inducción). El rectángulo discontinuo amarillo señala los tiempos de máxima expresión de los genes UDA durante el crecimiento vegetativo. El rectángulo discontinuo rojo señala el pico de expresión de los genes UDA durante el desarrollo asexual, mientras que el rectángulo azul señala la inducción de la expresión de los genes CDP. Los niveles de RNA ribosómico, rRNA, se muestran a modo de control de carga. Experimento realizado por los Drs. A. Garzia, E. Herrero-García y E.A. Espeso.

Tras la secuenciación, se comprobó la homogeneidad y reproducibilidad de las muestras tal y como se describe en el Anexo 1. Tras ello, se examinaron los resultados obtenidos en el RNA-seq. Este tercer capítulo engloba los resultados generales del experimento de secuenciación, centrándose en la identificación de procesos celulares que podrían verse alterados en ausencia de actividad FlbB. Ello permitirá centrar los experimentos que se presentarán y discutirán en el capítulo cuatro.

2.- Genes significativamente desregulados en ausencia de actividad FlbB.

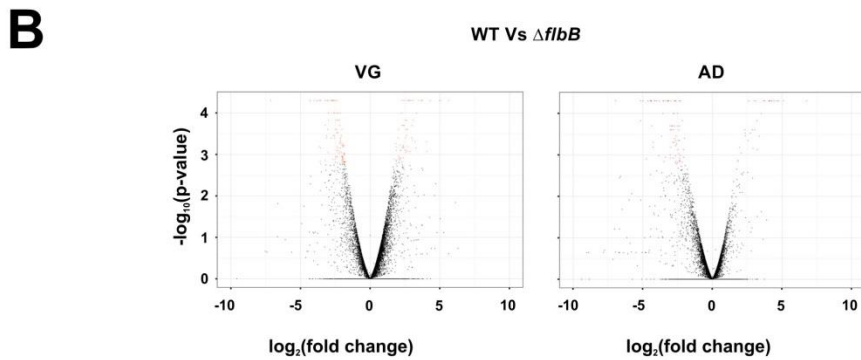
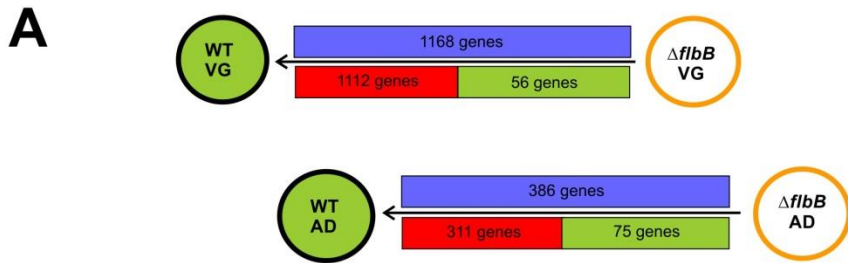
En la secuenciación se obtuvo un promedio de 8 856 181 lecturas de 72 pares de bases por muestra (70 849 449 lecturas para los 8 muestras), lo que equivale a cerca de 20.9 veces la longitud de genoma de *A. nidulans* por muestra (aproximadamente 167 veces la longitud del genoma con las 8 muestras). Dichas lecturas se mapearon con respecto al genoma de referencia y se observó que de los 10 943 transcritos predichos para *A. nidulans* en el *Aspergillus Genome Database*, 9763 (89.2% del total) se expresaban en la cepa silvestre en VG y 10 059 (91.9%) en fase AD. En el caso de la cepa $\Delta flbB$, 9866 (90.1%) genes se expresaron en la fase VG y 9988 (91.3%) en la fase AD. Sólo 199 genes se expresaron de forma exclusiva en la cepa silvestre y 302 genes en el mutante nulo de *flbB*. En términos generales, se pudo concluir que casi todo el conjunto de genes codificados por el genoma de *A. nidulans* se expresó al considerar ambas etapas del desarrollo y fondos genéticos.

2.1. FlbB y su posible función como activador transcripcional.

El mapeo de las lecturas indicó que los genes expresados en ambas cepas, silvestre y $\Delta flbB$, fueron 9564 (87.4%) en la fase VG y 9812 (89.7%) en la fase AD. El parámetro FPKM para cada gen y en cada fase de desarrollo indica el valor cuantitativo y normalizado de las lecturas (representa el nivel de expresión). La diferencia de expresión de cada uno de estos genes se analizó cuantitativamente a través del parámetro \log_2FC (*Fold change*). Los genes cuya expresión disminuía en ausencia de FlbB mostraron valores superiores a cero ($\log_2FC > 0$) y los genes cuya expresión aumentaba en ausencia de FlbB mostraron valores negativos ($\log_2FC < 0$). Asimismo, se consideró el cambio de expresión significativo cuando el valor del parámetro q era inferior a 0.05 (ver capítulo 2, apartado 12.2). Todos los valores (FPKM), las diferencias (\log_2FC) y significancias (valor q) en la expresión de genes se presentaron clasificados en tablas

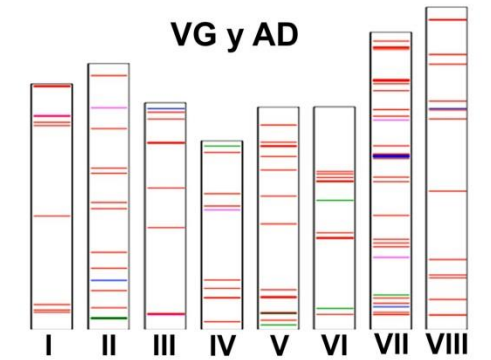
Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

(Oartzabal-Arano *et al.*, 2015) y se resumen en las gráficas Vulcano que se muestran en la Figura 3.2B.



C
Inhibición de la expresión en ausencia de FibB en VG y AD

Gen	Cromosoma	Coordenada	Gen	Cromosoma	Coordenada
AN6413	Chromosome I	263852	AN9165	Chromosome VI	231317
AN6401	Chromosome I	298404	AN3230	Chromosome VI	1392710
AN6373	Chromosome I	381489	AN3228	Chromosome VI	1402956
AN5939	Chromosome I	1737725	AN3226	Chromosome VI	1407003
AN6774	Chromosome I	3120967	CYP631B1	Chromosome VI	1408873
AN6788	Chromosome I	3170948	AN3206	Chromosome VI	1480835
AN6812	Chromosome I	3260708	AN2955	Chromosome VI	2262553
AN6960	Chromosome I	3715298	AN2954	Chromosome VI	2273441
AN6963	Chromosome I	3730062	AN2941	Chromosome VI	2325927
pepJ	Chromosome II	333193	AN2924	Chromosome VI	2380864
AN8046	Chromosome II	595244	AN2912	Chromosome VI	2417460
AN8155	Chromosome II	937766	alcS	Chromosome VII	227576
trxB	Chromosome II	1181567	alcA	Chromosome VII	230912
AN4180	Chromosome II	1850398	AN8969	Chromosome VII	263224
AN4148	Chromosome II	1944776	AN11153	Chromosome VII	400280
AN3996	Chromosome II	2391335	AN8910	Chromosome VII	481319
AN10505	Chromosome II	2469691	AN1588	Chromosome VII	1265062
AN3781	Chromosome II	3073518	agnE	Chromosome VII	1324276
AN3526	Chromosome II	3886421	AN1621	Chromosome VII	1379569
pppC	Chromosome III	237310	AN1734	Chromosome VII	1745931
AN5027	Chromosome III	244930	AN1920	Chromosome VII	2262137
AN4599	Chromosome III	159647	AN1941	Chromosome VII	2332402
AN4394	Chromosome III	2165982	AN2025	Chromosome VII	2615524
AN8774	Chromosome III	2849632	AN2043	Chromosome VII	2682641
AN11120	Chromosome III	2864047	AN2044	Chromosome VII	2686178
AN8661	Chromosome III	3221381	AN11864	Chromosome VII	2811586
AN8628	Chromosome III	3326243	AN2228	Chromosome VII	3264627
AN7385	Chromosome IV	119375	AN2262	Chromosome VII	3365098
AN7269	Chromosome IV	482367	AN2263	Chromosome VII	3367219
AN7267	Chromosome IV	485028	AN2352	Chromosome VII	3656318
AN7266	Chromosome IV	486819	AN2387	Chromosome VII	3762207
AN7265	Chromosome IV	488659	AN2398	Chromosome VII	3799483
AN7264	Chromosome IV	489843	AN10297	Chromosome VII	3813028
AN7222	Chromosome IV	630008	AN2407	Chromosome VII	3825982
AN7181	Chromosome IV	757009	easA	Chromosome VII	4288452
flbB	Chromosome IV	1889783	easB	Chromosome VII	4313089
AN7594	Chromosome IV	2079203	easC	Chromosome VII	4321940
AN12088	Chromosome IV	2710082	easD	Chromosome VII	4323905
pggC	Chromosome V	142833	AN2578	Chromosome VII	4414498
AN8367	Chromosome V	254351	AN9300	Chromosome VIII	220918
AN8368	Chromosome V	255598	AN11210	Chromosome VIII	224076
AN8369	Chromosome V	258021	AN9380	Chromosome VIII	460350
AN8439	Chromosome V	485591	AN1338	Chromosome VIII	791684
AN11079	Chromosome V	488126	AN1322	Chromosome VIII	832620
AN8445	Chromosome V	505695	AN1243	Chromosome VIII	1070769
AN8477	Chromosome V	607701	AN0903	Chromosome VIII	2117853
AN5245	Chromosome V	1616225	AN0546	Chromosome VIII	3223452
AN5664	Chromosome V	2042315	AN0500	Chromosome VIII	3359678
AN5550	Chromosome V	2441648	AN0457	Chromosome VIII	3495941
AN5487	Chromosome V	2648417	flbD	Chromosome VIII	4060949
AN5444	Chromosome V	2799910	ivoB	Chromosome VIII	4208565
AN5437	Chromosome V	2814273	AN0230	Chromosome VIII	4210291
AN5421	Chromosome V	2865556	tmpA	Chromosome VIII	4736178
AN5330	Chromosome V	3129243	AN0054	Chromosome VIII	4739984
AN5329	Chromosome V	3130527	AN0053	Chromosome VIII	4744983



Inducción de la expresión en VG y AD

Gen	Cromosoma	Coordenada	Gen	Cromosoma	Coordenada
AN7893	Chromosome II	163722	AN8099	Chromosome II	752073
cipB	Chromosome II	167354	AN8608	Chromosome III	3381106
AN7896	Chromosome II	171086	gelD	Chromosome VII	348173
AN7898	Chromosome II	175939	AN2030	Chromosome VII	2638096
AN7899	Chromosome II	178094	AN2031	Chromosome VII	2639262
AN7901	Chromosome II	182132	AN2032	Chromosome VII	2640607
AN7832	Chromosome IV	2807782	AN2033	Chromosome VII	2647940
AN8308	Chromosome V	69779	AN2034	Chromosome VII	2649537
AN8366	Chromosome V	243479	AN2037	Chromosome VII	2663256
AN9141	Chromosome VI	322063	AN2038	Chromosome VII	2667020
AN11702	Chromosome VI	1977238	AN0493	Chromosome VIII	3382781
AN8894	Chromosome VII	528278			

Inhibición en VG/Inducción en AD

Gen	Cromosoma	Coordenada
AN6820	Chromosome I	3277884
AN3681	Chromosome II	3392941
AN5033	Chromosome III	223936
AN7524	Chromosome IV	1831427
AN1540	Chromosome VII	1104009
AN2207	Chromosome VII	3205096

Figura 3.2. Análisis general los genes desregulados significativamente. A) Diseño experimental y número de genes desregulados significativamente en cada condición. Las flechas negras señalan los resultados de las dos comparaciones transcripcionales entre las cepas $\Delta flbB$ y WT analizadas en este trabajo (19 h de crecimiento vegetativo, VG, y 5 h de desarrollo asexual, AD). El color morado indica el número de genes significativamente desregulados, el rojo el número de genes cuya expresión se inhibe en ausencia de actividad FlbB, y el verde los genes que se inducen. B) Gráficas Vulcano representando los cambios de expresión al comparar la cepa $\Delta flbB$ y su cepa isogénica silvestre en VG (izquierda) y AD (derecha), respectivamente. Los genes (puntos) con un cambio de expresión significativo se muestran en rojo, y aquellos con cambios de expresión no significativos en negro. Los valores $\log_2 FC > 0$ corresponden a los genes cuya expresión se inhibe en la cepa $\Delta flbB$, mientras que los valores $\log_2 FC < 0$ corresponden a genes cuya expresión se induce en ese mismo fondo genético. C) Listado de genes significativamente desregulados en ambas comparaciones (VG y AD) y su distribución cromosómica. En rojo y verde están, respectivamente, los genes reprimidos e inducidos en el fondo $\Delta flbB$. Muchos de los genes inducidos en el fondo $\Delta flbB$ se hallan de forma prácticamente contigua en el genoma (color verde en Chr II). En azul están los genes inducidos en fondo $\Delta flbB$ en VG pero reprimidos en AD, de los cuales, la mayoría son genes contiguos del Chr VII. Por último, en rosa están representados los genes reprimidos en fondo $\Delta flbB$ en VG pero inducidos en AD.

De un total de 9564 genes expresados en los dos fondos genéticos, 1168 presentaron una expresión diferencial significativa en la fase VG (Figura 3.2A). De ellos, 1112 genes disminuían la expresión en ausencia de FlbB ($\log_2 FC > 0$), mientras que 56 fueron inducidos ($\log_2 FC < 0$). Por otro lado, 386 transcritos de un total de 9812 presentaron una expresión diferencial significativa en AD, siendo 311 reprimidos y 75 inducidos en ausencia de FlbB. Estos datos indicaron que el número de genes reprimidos en ausencia de FlbB en VG fue 3.6 veces más alto que los reprimidos en fase AD. Sin embargo, la tasa de los genes inducidos en ausencia de FlbB en VG frente AD fue de 0.75. Estos resultados llevaron a sugerir que la actividad FlbB tenía un impacto directo o indirecto más amplio en la activación de procesos celulares durante la etapa VG mientras que un supuesto papel represor parecía adquirir más importancia en AD.

De los 1168 (VG) y 386 (AD) genes desregulados significativamente, 139 eran comunes a ambos análisis (Figura 3.2C). De ellos, 110 genes estaban reprimidos en ausencia de FlbB tanto en VG como en AD, y 12 inducidos. En consecuencia, y aunque también se encontraron

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

genes con alternancia de perfiles de expresión (11 que estaban inducidos en VG, pero reprimidos en AD y 6 con el comportamiento opuesto), la mayoría de los genes desregulados significativamente disminuían la expresión en ausencia de FlbB en ambas fases del desarrollo.

En términos generales, los resultados obtenidos sugirieron que la actividad FlbB influye en la expresión de diferentes grupos de genes en cada etapa de desarrollo y que el FT tiene potencialmente un papel más amplio como activador transcripcional que como represor.

2.2. Los términos de ontología génica (GO) y el perfil de expresión de los genes desregulados significativamente permiten la identificación de procesos celulares alterados en ausencia de *flbB*.

La gran mayoría de los genes significativamente desregulados eran genes no caracterizados hasta la fecha, de modo que su clasificación mediante los términos de ontología génica (GO: *Gene Ontology*) contribuyó a alcanzar una visión global de los procesos celulares y funciones moleculares alterados en ausencia de actividad FlbB. Los paneles A y B de la Figura 3.3 muestran cada uno dos tipos de análisis GO. El Componente Celular sugiere el compartimento celular donde el producto del gen es probablemente activo y el Proceso Biológico designa el proceso celular al que el producto del gen o genes contribuirían (Ashburner *et al.*, 2000). Hay un tercer análisis, la Función Molecular, que es definido como la actividad bioquímica del producto del gen. Este análisis también fue realizado en ambas fases (VG y AD) pero no se ha añadido en la Figura 3.3 porque los resultados no resaltaron ninguna función molecular que estuviera claramente afectada en ausencia de FlbB.

Los resultados de ambos análisis GO aportaron datos similares en las dos comparaciones. El análisis del Componente Celular en los paneles 3.3A (VG) y 3.3B (AD) sugirió que la mayor proporción de genes significativamente desregulados en el fondo nulo de *flbB* estaban localizados en fracciones membranosas (29 y 51%, respectivamente), en el núcleo y en

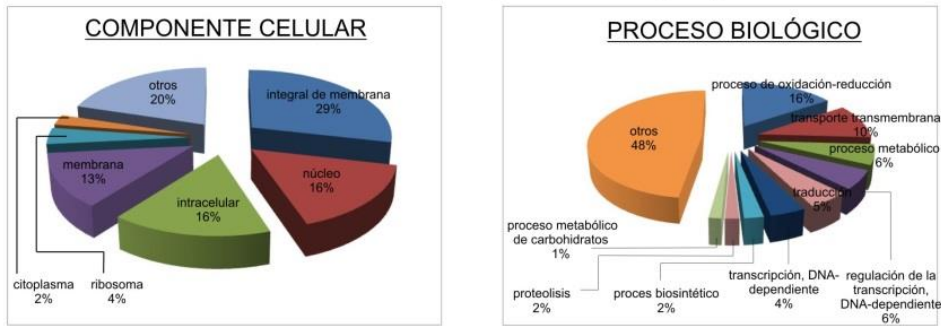
localizaciones intracelulares. Por otro lado, los procesos biológicos más severamente afectados serían los de oxido-reducción, el transporte transmembrana, y los procesos metabólicos, así como la regulación de la transcripción y la traducción. En la fase asexual, inducida mediante la exposición al aire, estas alteraciones podrían estar relacionadas con la presencia de un entomo oxidante y carente de nutrientes. En la fase vegetativa, sin embargo, estos procesos podrían indicar una predisposición o preparación de la célula a ése cambio de entorno (ver Discusión).

El mapa de calor en la Figura 3.3C se generó agrupando los genes significativamente más desregulados por perfiles de expresión (PE) similares, lo cual, podría indicar una función común o un mismo intervalo temporal donde desempeñar sus funciones. Los perfiles de expresión de tres grupos se analizan en profundidad en los paneles 3.3D, 3.3E y 3.3F.

El grupo PE1 (Figura 3.3D) engloba genes que aumentan significativamente su expresión en un fondo $\Delta flbB$ en ambas fases del desarrollo, pero sobre todo en la fase AD. Incluye muchos de los genes del metabolismo secundario que se analizarán en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral. Los grupos PE2 y PE3, por el contrario, engloban genes cuya transcripción está fuertemente reprimida en el mutante nulo de *flbB* (Figuras 3.3E y 3.3F, respectivamente). Los genes del perfil PE2 exhiben niveles más altos de expresión en el fondo silvestre tanto en VG como en AD. Sin embargo, los genes del grupo PE3 presentan baja o muy baja expresión en VG pero, son activados al principio de desarrollo del conidióforo. Algunas de las proteínas que desempeñan funciones específicas en el control del desarrollo asexual son codificadas por los genes que muestran este perfil de expresión PE3, como por ejemplo, *brlA*.

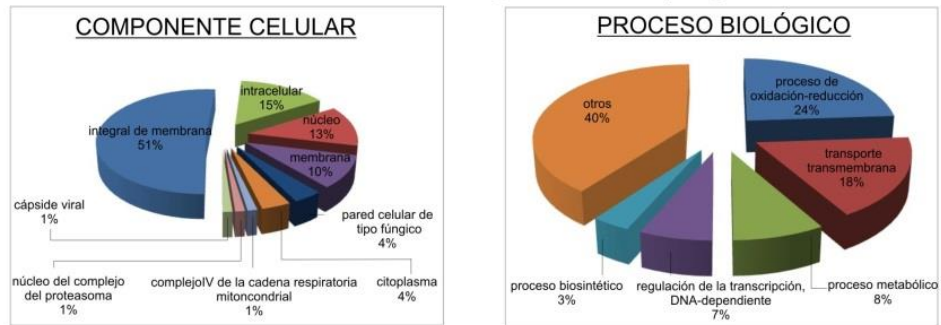
A

Análisis de Ontología Génica (VG)

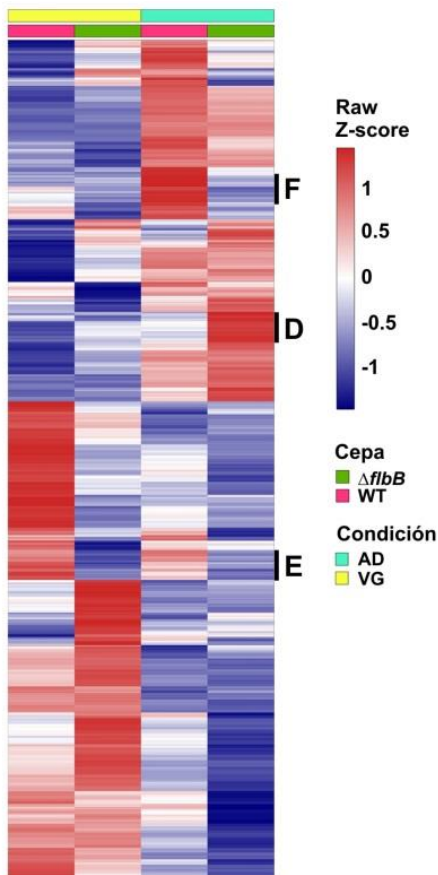


B

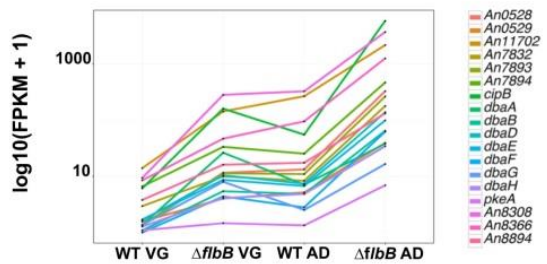
Análisis de Ontología Génica (AD)



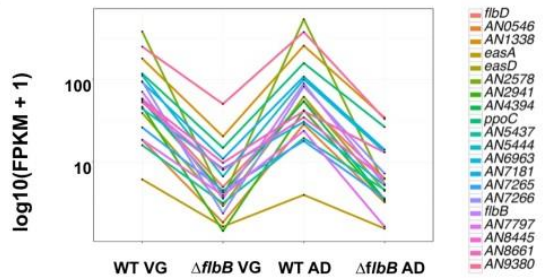
C



D



E



F

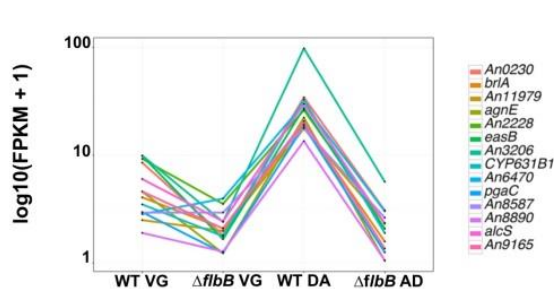


Figura 3.3. Clasificación de los genes significativamente desregulados. A) y B) Términos GO asignados a los genes previamente no caracterizados y diferencialmente expresados en las comparaciones correspondientes a las fases VG y AD, respectivamente (Figuras ampliadas en el Anexo 2). C) Mapa de calor que incluye aquellos genes que exhiben los cambios de expresión génica estadísticamente más significativos (205 genes en total) según las correcciones test t y Benjamini-Hochberg (Benjamini *et al.*, 2001). Esta representación agrupa jerárquicamente los genes por su similitud en los cambios de expresión, los cuales a su vez, están clasificados mediante la puntuación bruta Z-score de los valores \log_2 FPKM. Tres grupos de genes con similares perfiles de expresión se analizan en detalle en los paneles D, E y F. Las gráficas en estos paneles representan los valores \log_{10} (FPKM+ 1) para cada gen en cada cepa y el etapa del desarrollo.

2.3. Análisis de los genes Top20: funciones celulares cuantitativamente más desreguladas en ausencia de FlbB.

Las tablas Top20 engloban los genes más desregulados, es decir, los 20 genes que tienen los valores más altos (reprimidos en ausencia de FlbB; \log_2 FC>0) y más bajos (inducidos en ausencia de FlbB; \log_2 FC<0) de \log_2 FC en cada fase de desarrollo. Se podrían considerar como genes candidatos para ser estudiados funcionalmente en profundidad. Con el objetivo de obtener información más detallada sobre la función que las proteínas que derivan de estos genes pudieran tener en el control del desarrollo y/o otros procesos celulares, se acudió a la AspGD y la *Aspergillus Comparative Database*. Aquellos genes que codifican proteínas sin una función predicha se muestran con el término “desconocido”.

En un primer análisis de la Tabla 3.1, se pudo observar la presencia de genes prácticamente contiguos en el genoma, los cuales, pertenecen a dos *cluster* metabólicos. Por un lado, el *cluster dba* (*An7893-An7903*), recientemente caracterizado y cuyo nombre proviene de las siglas en inglés *derivative of benzaldehyde* (Gerke *et al.*, 2012) (Figura 3.3D). Por el otro, el *cluster An2030-An2038* (Ahuja *et al.*, 2012). Una primera aproximación al efecto que la delección de *flbB* tiene sobre el metabolismo secundario se realiza en la siguiente sección (3.1), mientras que en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral se analizarán más en detalle estos dos *cluster* metabólicos (capítulo 4). En un segundo análisis, este capítulo también intenta

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

explicar los resultados obtenidos con los genes implicados en el desarrollo asexual (como por ejemplo, *brlA*, *ivoB*, *ivoC*, *rodA*, y *An4394*) (sección 3.2).

Top	Gen	Valor $\Delta flbB$ VG	Valor WT VG	log ₂ FC	Función predicha
Genes cuya expresión es reprimida en la cepa $\Delta flbB$					
1	AN2578	3,37	1307,97	8,60	Actividad peroxidasa
2	AN8910	0,06	19,98	8,30	Policétido sintasa (PKS)
3	trxB	0,92	147,25	7,32	Tiorredoxina reductasa
4	AN2941	0,95	115,28	6,93	Desconocido
5	AN7266	2,28	204,04	6,49	Desconocido
6	AN0546	0,36	32,10	6,48	Desconocido
7	AN11210	0,50	43,85	6,45	Desconocido
8	AN10473	0,16	13,52	6,44	Desconocido
9	AN10505	0,10	8,57	6,42	Hidrolasa de ramnogalacturonano insaturado
10	AN11990	0,76	63,25	6,37	Desconocido
11	AN5664	0,47	35,93	6,26	Desconocido
12	flbB	2,12	153,27	6,18	Factor de Transcripción implicado en regulación del desarrollo del conidióforo
13	AN3557	0,98	62,70	6,00	Desconocido
14	agnE	0,20	11,68	5,90	α -1,3-glucanasa
15	AN3228	0,12	6,93	5,87	Preniltransferasa
16	AN11215	1,53	71,75	5,55	Actividad transportadora transmembrana de iones metálicos
17	AN2352	0,48	22,58	5,55	Desconocido
18	AN8445	3,08	127,78	5,37	Aminopeptidase Y
19	AN11313	3,53	141,02	5,32	Desconocido
20	AN4394	3,82	143,46	5,23	Regulación positiva de la esporulación asexual
Top	Gen	Valor $\Delta flbB$ VG	Valor WT VG	log ₂ FC	Función predicha
Genes cuya expresión es inducida en la cepa $\Delta flbB$					
1	AN2034	187,30	3,12	-5,91	Desconocido
2	AN7898	18,23	0,31	-5,87	Papel en el transporte transmembrana
3	gelD	501,96	9,38	-5,74	1,3- β -transglucosidasa
4	AN8308	530,99	12,35	-5,43	Desconocido
5	AN2035	6,09	0,15	-5,33	Policétido sintasa
6	cipB	323,65	8,23	-5,30	Oxidorreductasa
7	AN2032	10,68	0,40	-4,73	Policétido sintasa
8	AN2031	48,36	2,00	-4,60	Desconocido
9	AN2033	66,93	3,66	-4,19	Actividad monooxigenasa
10	AN2038	71,01	3,90	-4,19	Actividad oxidorreductasa
11	AN2030	244,00	13,74	-4,15	Oxidorreductasa
12	AN2036	27,90	1,63	-4,09	Factor de transcripción con función en el control del metabolismo secundario
13	AN7896	44,34	2,76	-4,01	Factor de transcripción miembro del <i>cluster dba</i>
14	AN2037	558,34	41,44	-3,75	Oxidorreductasa de unión a NAD
15	AN8099	70,91	6,03	-3,56	Oxalato decarboxilasa
16	AN7796	116,56	13,19	-3,14	Papel en transporte transmembrana
17	AN11702	268,14	30,67	-3,13	Desconocido
18	AN7901	15,78	1,94	-3,02	Factor de transcripción miembro del <i>cluster dba</i>
19	furE	514,57	64,50	-3,00	Proteína homóloga al transportador de uracilo Fur4p de <i>S. cerevisiae</i>
20	AN6782	15,10	1,91	-2,99	Actividad simporte sodio/dicarboxilato

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

Top	Gen	Valor $\Delta flbB$ AD	Valor WT AD	log ₂ FC	función predicha
Genes cuya expresión es reprimida en la cepa $\Delta flbB$					
1	AN6401	1,97	929,35	8,89	Hidrofobina
2	agnE	0,12	32,10	8,08	α -1,3-glucanasa
3	AN1941	1,60	398,07	7,96	Proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI)
4	AN3227	0,11	24,18	7,80	Actividad monooxigenasa
5	AN5370	0,11	21,79	7,69	Papel en transporte transmembrana
6	ivoB	1,07	214,46	7,64	Fenol oxidasa específica del conidióforo
7	abnC	0,30	45,06	7,22	Proteína con actividad arabinan endo-1,5- α -L-arabinosidasa
8	AN0587	0,10	12,16	6,92	Hsp70 de familia chaperona
9	AN8890	0,14	16,95	6,90	Actividad catalítica y de fijación de carbohidratos
10	AN2578	8,19	804,59	6,62	Actividad peroxidasa
11	rodA	0,95	93,00	6,62	Hidrofobina implicada en el desarrollo de conidios
12	easC	0,46	45,18	6,61	Aciltransferasa requerida para biosíntesis de emericelamida
13	AN8774	0,11	9,16	6,41	Desconocido
14	brlA	0,31	25,22	6,36	Factor de transcripción regulador del desarrollo del conidióforo
15	AN3247	0,26	20,83	6,35	Fijador de ATP, actividad ATPasa
16	AN7385	0,29	21,55	6,20	Fosfatidilserina decarboxilasa
17	AN3228	0,86	56,93	6,05	Preniltransferasa
18	ivoC	0,11	6,81	6,01	Citocromo P450
19	AN3339	0,17	10,20	5,87	Fijador de nucleótido, actividad oxidorreductasa, actividad transferasa
20	AN3304	0,11	6,22	5,85	Transportador de ácido γ -aminobutírico (GABA)
Top	Gen	Valor $\Delta flbB$ AD	Valor WT AD	log ₂ FC	Función predicha
Genes cuya expresión es inducida en la cepa $\Delta flbB$					
1	cipB	6287,20	53,25	-6,88	Oxidorreductasa
2	AN7900	69,54	1,98	-5,14	Oxidorreductasa
3	AN7893	284,06	10,12	-4,81	Actividad oxidorreductasa
4	AN0528	381,75	14,08	-4,76	Papel en transporte transmembrana
5	AN7832	208,22	8,63	-4,59	Fijador de flavín adenín dinucleótido, actividad oxidorreductasa
6	AN7898	156,95	6,76	-4,54	Papel en transporte transmembrana
7	AN11584	222,26	9,58	-4,54	Desconocido
8	AN7899	103,42	4,99	-4,37	Esterasa/lipasa
9	AN7894	532,06	27,54	-4,27	Desconocido
10	AN7897	71,03	3,79	-4,23	Actividad monooxigenasa
11	AN7903	7,38	0,40	-4,20	Policétido sintasa
12	AN8366	1365,44	96,15	-3,83	Papel en transporte transmembrana
13	AN3567	112,27	8,81	-3,67	Desconocido
14	AN8308	3496,21	285,41	-3,61	Desconocido
15	AN2593	4,51	0,40	-3,48	Dominio de actividad oxidorreductasa y papel en proceso metabólico
16	AN8593	28,86	2,72	-3,40	Actividad hidrolasa
17	AN7333	8,35	0,86	-3,28	Desconocido
18	AN7901	18,75	2,01	-3,22	Factor de transcripción miembro del <i>cluster dba</i>
19	AN7902	38,96	4,22	-3,21	Monooxigenasa fijadora de FAD
20	AN11702	2563,91	283,34	-3,18	Desconocido

Tabla 3.1. Tablas Top20 que incluyen los genes con mayores (reprimidos en fondo nulo de *flbB*) o menores (inducidos en dicho fondo genético) valores log₂FC, tanto para la fase VG como para AD. Se incluyen los valores FPKM en cada cepa y condición así como la descripción (en los casos en los que existe una predicción) de su posible función.

Antes de proceder con el análisis funcional de un gen determinado o grupos de genes que pudieran ser de interés, se intentó confirmar su desregulación en fondo $\Delta flbB$ mediante otro método transcriptómico distinto al RNA-seq. Ello contribuyó a evitar falsos positivos, ya que los valores ajustados en la correlación de alguna de las réplicas biológicas (ver Anexo 1) podían haber repercutido en la reproducibilidad de determinados resultados. Por ejemplo, se observó que 175 genes que podrían codificar helicasas y proteínas nucleolares presentaban una represión significativa de su expresión en la fase VG y el fondo $\Delta flbB$ (no mostrado). Sin embargo, no se pudo confirmar mediante *Northern-blot* la desregulación de *AN5931* (el cual, codifica una Helicasa de RNA ATP-dependiente, ortólogo de *Dbp2p* de *S. cerevisiae*) observada en los resultados de RNA-seq, por lo que no se profundizó en el estudio de estos genes. En otros casos, la ausencia de un fenotipo de interés para el mutante nulo fue razón suficiente para no proceder con un análisis funcional más detallado. Por ejemplo, se generaron cepas con deleciones de los genes *An2578* y *An8910*, Top 1 y 2, respectivamente, de los genes reprimidos en $\Delta flbB$ en fase VG (Tabla 3.1). Los mutantes mostraron un fenotipo silvestre en las condiciones analizadas (Anexo 3). Finalmente, en el caso de los factores que controlan el desarrollo asexual, los resultados de secuenciación coinciden cualitativamente con lo publicado anteriormente, por lo que se dieron por buenos. En términos generales, se concluyó que los resultados del RNA-seq deben analizarse de forma orientativa y deben confirmarse mediante técnicas transcripcionales y análisis funcionales adicionales para definir las líneas de estudio a seguir. Finalmente, añadir que no puede ser descartado un papel importante en la conidiación y/o otros procesos celulares para genes desregulados en ausencia de actividad FlbB pero con valores menores de $\log_2 FC$.

3.- Resultados del RNA-seq correspondientes a procesos biológicos específicos.

3.1. La ausencia de *flbB* y la expresión de genes del metabolismo secundario.

La actividad de MMSS específicos es necesaria en la inducción del desarrollo asexual (Calvo *et al.*, 2002;Rodriguez-Urra *et al.*, 2012;Roncal *et al.*, 2002). Los resultados de la Tabla 3.1 y la Figura 3.3D motivaron el estudio de la posible presencia de genes significativamente desregulados situados de forma contigua en el genoma y que podrían codificar funciones típicas de un *cluster* metabólico. Para ello, se utilizaron como referencia los genes que codifican PKS y NRPSs (Ahuja *et al.*, 2012).

La Figura 3.4A muestra los genes que, codificando PKSs y NRPSs, están significativamente desregulados en las fases VG y/o AD. Se incluyen además los genes de los *cluster* del MMSS correspondientes que también están significativamente inducidos o reprimidos. En total, se identificaron cuatro *cluster* de genes que mostraban cambios de expresión significativos en al menos cuatro de los genes que los componían. Estos cuatro *cluster* vienen definidos por las siguientes PKS/NRPSs: *An2545/easA* y *An2547/easB*, que codifican una NRPS y una PKS, respectivamente, del *cluster* de la emericelamida (Alves *et al.*, 2016;Chiang *et al.*, 2008); *An3230/pkfA*, que codifica una PKS implicada en la síntesis de la Aspernidina A (Ahuja *et al.*, 2012;Yaegashi *et al.*, 2013); *An7903/pkeA/dbal*, una PKS que pertenece a un *cluster* implicado en la síntesis del violaceol (Nielsen *et al.*, 2011) y el derivado del benzaldehído DHMBA (Ahuja *et al.*, 2012;Gerke *et al.*, 2012) y las PKSs que son codificadas por los genes *An2032/pkhA* y *An2035/pkhB* (Ahuja *et al.*, 2012), ambas dentro de un mismo *cluster*.

Los niveles de expresión de los genes del *cluster* de la emericelamida (EAS) (*An2545-An2549*) (Chiang *et al.*, 2008) cayeron significativamente en el mutante nulo de *flbB*, tanto en VG como AD (Figura 4A, 4B). Las EASs son depsipéptidos cíclicos, péptidos en los que uno o más enlaces amida han sido reemplazados por enlaces éster. En este caso, el *cluster* controla la síntesis de la Emericelamida A (Chiang *et al.*, 2008). Este compuesto fue identificado por primera vez tras realizar un co-cultivo del hongo de origen marino *Emericella parvathecica* (referido a la forma sexual o forma teleomorfa de *Aspergillus*) y el actinomiceto marino *Salinispora Arenicola*, y tiene una actividad antibiótica limitada contra una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (Chiang *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2007).

La expresión de genes específicos del *cluster* de la Aspernidina A también está aparentemente reprimida significativamente en fondo genético $\Delta flbB$ (Figura 3.4A, 3.4B). La Aspernidina A es un alcaloide que muestra efectos antiproliferativos moderados contra diferentes líneas celulares tumorales (Scherlach *et al.*, 2010). Es sintetizado por el *cluster* definido por *An3230/pkfA*. Este *cluster* se induce en el mutante nulo del gen *mpkA*, el cual codifica una MAPK (de sus siglas en inglés, *mitogen-activated protein kinase*) (Ahuja *et al.*, 2012; Yaegashi *et al.*, 2013) y cuya ausencia genera defectos de crecimiento moderados (De Souza *et al.*, 2013). Tanto en el caso de la Emericelamida A como en el de la Aspernidina A se desconoce relación alguna con los genes UDA o el desarrollo asexual.

Los resultados obtenidos en el estudio de los *cluster An2030-An2038* y *dba* se describirán de forma más detallada en el siguiente capítulo.

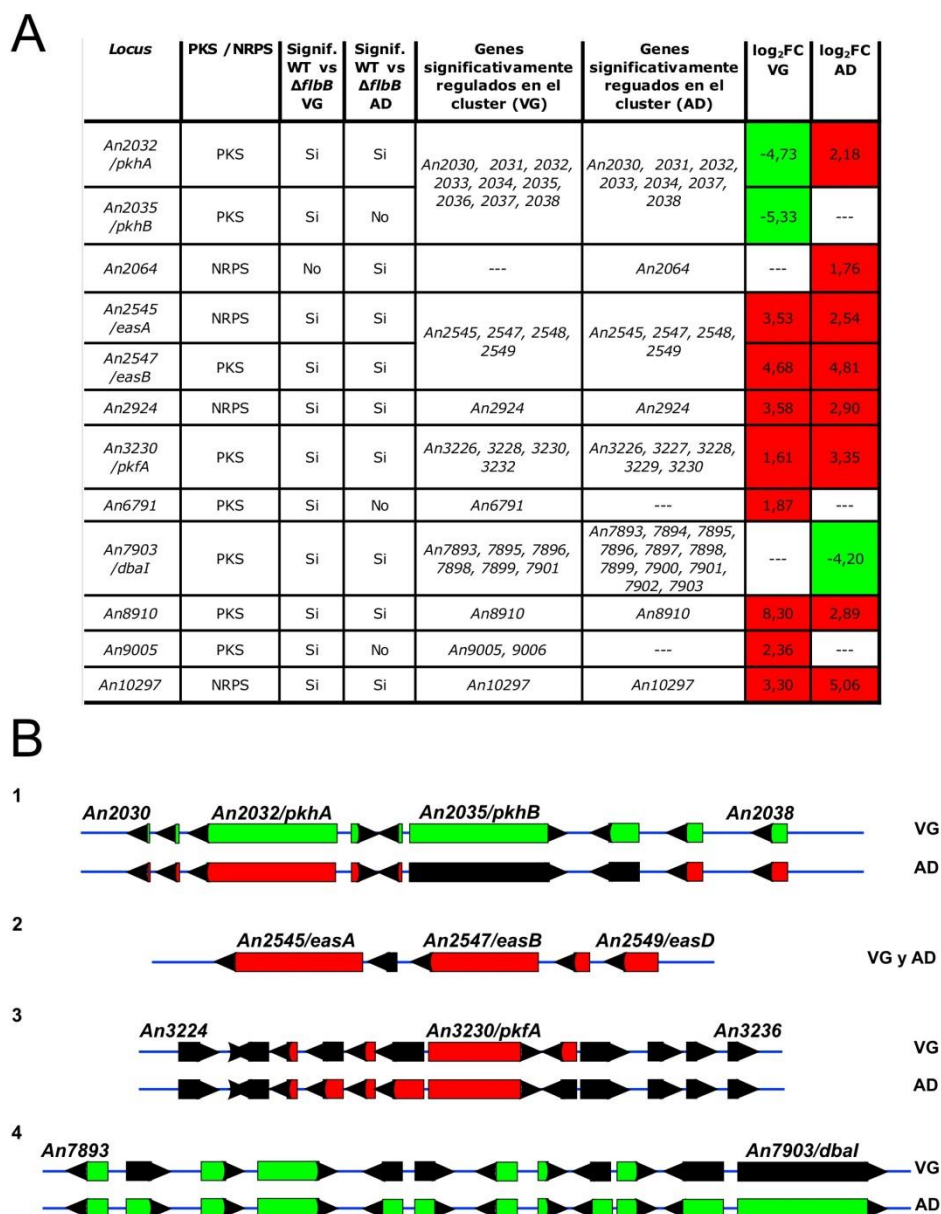


Figura 3.4. Desregulación de *cluster* metabólicos en un fondo genético $\Delta flbB$. A) Tabla que muestra los genes que, codificando enzimas PKS y NRPS, están significativamente desregulados en ausencia de FlbB en fases VG y/o AD. El color rojo indica represión en ausencia de actividad FlbB ($\log_2FC > 0$) mientras que el color verde corresponde a genes inducidos ($\log_2FC < 0$). La tabla también muestra aquellos genes que, perteneciendo a un determinado *cluster*, están significativamente desregulados en fondo genético $\Delta flbB$. B) Patrón de expresión de los *cluster* metabólicos con al menos cuatro genes significativamente desregulados en las etapas VG y/o AD. Se indica la posición de cada PKS o NRPS y también el primer y último gen de cada *cluster*. Los genes que no están significativamente desregulados están en negro. La extensión de los *cluster* de MMSS definidos por las enzimas An2545/easA y An2547/easB o An3230/pkfA fueron delimitados de acuerdo con (Chiang *et al.*, 2008) y (Khaldi *et al.*, 2010). Los resultados publicados por (Gerke *et al.*, 2012) y nuestros análisis *in silico* fueron utilizados como referencia para el *cluster dba*. La extensión del *cluster* An2030–An2038 fue comparada con los límites establecidos en (Khaldi *et al.*, 2010) y modificada de acuerdo con nuestros análisis *in silico*.

3.2. La ausencia de actividad FlbB deriva en la inhibición de genes implicados en el desarrollo asexual.

El estudio de los cambios de expresión de genes implicados en el desarrollo asexual se realizó con el objetivo de corroborar y/o ampliar el modelo de control genético de la conidiación propuesto por Garzia y colaboradores (Garzia *et al.*, 2010). Para ello, se estudiaron los valores FPKM de los genes reguladores de la conidiación previamente conocidos, dividiéndolos en dos grupos: por un lado, aquellos que se expresan antes de la activación de *brlA* (ruta UDA), y por el otro lado, aquellos que se expresan posteriormente a la activación de *brlA* (ruta CDP) (Tabla 3.2).

Dentro de la ruta UDA, se identificaron cinco genes cuya expresión se reprimía en ausencia de FlbB: *An4394*, *flbD*, *afeA*, *tmpA* y *tmpB*. La caracterización funcional de *An4394* se describirá en el siguiente capítulo, ya que, ésta no había sido realizada previamente. La expresión de *flbD* fue, como se describe en el modelo de referencia (Garzia *et al.*, 2010), fuertemente reprimida en el mutante nulo de *flbB*, tanto en VG como en AD (Tabla 3.2). Finalmente, se observó que la expresión de los genes *afeA*, *tmpA* y *tmpB* estaba influenciada por la actividad FlbB, siempre a falta de confirmar los datos del RNA-seq mediante *Northern-blot* o qPCR. *tmpA* y *afeA* codifican, respectivamente, una flavoenzima transmembrana y una enzima formadora de adenilato (cataliza la condensación entre un ácido carboxílico y un fosfato) que participan en la síntesis una señal extracelular necesaria para la esporulación e independiente de aquella ligada a la actividad FluG (Soid-Raggi *et al.*, 2006; Soid-Raggi *et al.*, 2016). Tanto TmpA como AfeA actuarían en la misma vía (Soid-Raggi *et al.*, 2016). El gen *tmpB*, por su parte, también codifica una enzima formadora de adenilato necesaria para la conidiación (Soid-Raggi *et al.*, 2016). A pesar de que su expresión es reprimida en ausencia de

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

flbB en la fase AD, sus valores FPKM son tan bajos que no permiten realizar una interpretación fiable de los resultados (Tabla 3.2).

Locus	Tipo	Valor FPKM en $\Delta flbB$ VG	Valor FPKM en WT VG	\log_2FC VG	Sig VG	Valor FPKM en $\Delta flbB$ AD	Valor FPKM en WT AD	\log_2FC AD	Sig AD
Ruta UDA									
<i>afeA/An0054</i>	Proteína perteneciente a la superfamilia de enzimas adenilato formadoras	18,8	218,7	3,54	si	39,5	235,8	2,58	si
<i>fadA/An0651</i>	Proteína G Heterotrimérica, subunidad α	59,6	135,7	1,19	no	62,7	49,3	-0,35	no
<i>flbA/An5893</i>	Regulador de la señalización de proteínas G	64,7	40,1	-0,69	no	32,7	29,9	-0,13	no
<i>flbB/An7542</i>	FT bZIP	2,1	153,3	6,18	si	3,0	107,6	5,18	si
<i>flbC/An2421</i>	FT C2H2	69,8	223,9	1,68	no	365,4	213,5	-0,78	no
<i>flbD/An0279</i>	FT c-MYB	4,0	103,1	4,70	si	6,6	61,3	3,22	si
<i>flbE/An0721</i>	Interactor de FlbB	80,2	101,6	0,34	no	37,1	42,5	0,20	no
<i>fluG/An4819</i>	Necesario para la síntesis del metabolito inductor	16,2	36,3	1,17	no	22,0	25,4	0,21	no
<i>ganB/An1016</i>	Proteína G Heterotrimérica, subunidad α	71,4	134,6	0,91	no	111,8	70,7	-0,66	no
<i>gpgA/An2742</i>	Proteína G Heterotrimérica, subunidad γ	257,9	327,6	0,34	no	190,7	128,7	-0,57	no
<i>sfaD/An0081</i>	Proteína G Heterotrimérica, subunidad β	148,2	118,6	-0,32	no	137,4	81,0	-0,76	no
<i>sfgA/An8129</i>	TF tipo Gal4 Zn(II)2Cys6, regulador negativo de la conidiación	51,2	88,1	0,78	no	38,6	59,7	0,63	no
<i>tmpA/An0055</i>	Flavoproteína transmembrana	2,8	25,4	3,17	si	9,4	32,2	1,78	si
<i>tmpB/An9129</i>	Proteína perteneciente a la superfamilia de enzimas adenilato formadoras	0,0	0,0	0,00	no	0,0	3,8	$1,80 \times 10^{308}$	si
<i>urdA/AN4394</i>	Regulación positiva de la esporulación asexual; Regulación de la transcripción	3,8	143,5	5,23	si	2,6	66,1	4,68	si
Ruta CDP									
<i>abaA/An0422</i>	FT TEA/ATTS	1,7	8,8	2,37	si	1,0	1,5	0,58	no
<i>brlA/An0973</i>	FT C2H2	3,1	5,6	0,85	no	0,3	25,2	6,36	si
<i>dewA/An8006</i>	Hidrofobina	0,0	1,3	$1,80 \times 10^{308}$	no	0,3	1,1	1,96	no
<i>ivoA/An1057</i>	NRPS	0,4	1,1	1,64	no	1,0	0,8	-0,40	no
<i>ivoB/An0231</i>	Fenol oxidasa	0,7	8,3	3,66	si	1,1	214,5	7,64	si
<i>ivoC/An10573</i>	Citocromo P450	0,1	0,0	$1,80 \times 10^{308}$	no	0,1	6,8	6,01	si
<i>medA/An6230</i>	Desconocido	80,7	57,3	-0,49	no	52,2	36,2	-0,53	no
<i>rodA/An8803</i>	Hidrofobina	3,2	3,0	-0,09	no	0,9	93,0	6,62	si
<i>stuA/An5836</i>	FT APSES	143,7	190,5	0,41	no	122,3	157,8	0,37	no
<i>vosA/An1959</i>	FT similar a Velvet	11,7	34,8	1,58	no	10,4	10,1	-0,04	no
<i>wA/An8209</i>	PKS	1,0	1,9	0,95	no	2,2	1,4	-0,68	no
<i>wetA/An1937</i>	Desconocido	1,4	2,9	1,11	no	3,2	1,5	-1,10	no
<i>yA/An6635</i>	p-difenol oxidasa	14,5	47,3	1,70	si	13,3	11,3	-0,24	no

Tabla 3.2. Valores FPKM y \log_2FC de genes que codifican proteínas reguladoras de la conidiación. Aquellos genes significativamente desregulados han sido resaltados en negra, indicando mediante el color rojo su represión en ausencia de actividad FlbB ($\log_2FC > 0$).

En cuanto a la ruta CDP, la expresión de *brlA*, primer gen de dicha ruta, se reprimió completamente en ausencia de *flbB* (véase el perfil de expresión PE3 en la Figura 3.3F). Pese a que los valores FPKM correspondientes a este gen en la fase AD no son muy altos (Tabla 3.2), la completa represión en su fondo nulo confirmó la necesidad de FlbB en el proceso de activación de *brlA* una vez que la conidiación ha sido inducida mediante la exposición del micelio al aire (Garzia *et al.*, 2010).

Por otro lado, el patrón de expresión observado para los genes *ivoB* e *ivoC*, los cuales codifican una enzima fenol oxidasa y un citocromo P450 necesarios para la pigmentación del conidióforo, mostró que la expresión de *ivoB* precede a la de *ivoC* (Birse y Clutterbuck, 1991; Garzia *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2009). La disminución de su transcripción podría ser consecuencia directa del cambio de expresión de los genes *brlA* y *abaA* en el fondo nulo *flbB* (Tabla 3.2), ya que ha sido demostrado que la expresión de *ivoB* depende de dichas actividades (Birse y Clutterbuck, 1991).

Finalmente, según nuestros resultados de secuenciación, la expresión de *rodA*, que codifica una hidrofobina (HPh), también estaría significativamente reprimida en la cepa $\Delta flbB$ (Tabla 3.2). Las proteínas HPhs contienen dominios compuestos por 8 cisteínas que, a través de la formación de puentes disulfuro, crean monocapas anfipáticas que se encuentran en la superficie de las conidias fúngicas, aumentando la hidrofobicidad de estas (de Groot *et al.*, 2009). El genoma de *A. nidulans* contiene seis genes que codifican HPh-s (de Groot *et al.*, 2009) y ha sido demostrado que estas proteínas están involucradas en la formación de un recubrimiento hidrofóbico (o capa *rodlet*; (Beever y Dempsey, 1978)) en la superficie de las esporas (Grunbacher *et al.*, 2014). Tres de esos genes (*An6401* y *An7539*, además de *rodA*) estarían desregulados de manera significativa en ausencia de *flbB*.

Es conocido que la expresión de *rodA* depende marcadamente de BrIA (Chang y Timberlake, 1993). Por ello, la destacada disminución en la expresión de *rodA* observada en la

comparación AD es probablemente también una consecuencia de la incapacidad para inducir *brlA* en el mutante nulo de *flbB*. La transcripción de *An6401/dewC* es reprimida en la cepa $\Delta flbB$ en ambas fases del desarrollo pero, esta hidrofobina parecía ser principalmente necesaria en AD porque fue el gen cuantitativamente más reprimido en el fondo $\Delta flbB$ (Top 1) en esa fase (Tabla 3.1). Esto también sugiere un papel *brlA*-dependiente en el control de la hidrofobicidad de las células del conidióforo, algo que es sustentado por los resultados obtenidos por Grünbacher y colaboradores (Grünbacher *et al.*, 2014), los cuales, describieron la inducción de *An6401/dewC* durante el desarrollo asexual junto con una menor hidrofobicidad de las células fúngicas para su mutante nulo.

En general, estos resultados sugieren que FlbB influye, tanto en VG y AD, en la expresión de los genes que codifican HPh-s, las cuales, son necesarias para la generación del recubrimiento hidrofóbico de las esporas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos resultados no han sido confirmados mediante *Northern-blot* o qPCR.

3.3. Análisis de una posible regulación positiva ejercida por FlbB sobre su propia transcripción.

Los resultados de la secuenciación presentados en la sección anterior apoyan el modelo de control del desarrollo asexual previamente propuesto por Garzia y colaboradores, según el cual FlbB controlaría la expresión de *flbD* y ambos FFTT regularían conjuntamente a *brlA* (Garzia *et al.*, 2010). Sin embargo, resultados experimentales obtenidos tanto con formas truncadas de FlbB como con ciertos mutantes puntuales permitieron detectar una marcada disminución en los niveles de proteína FlbB o alteración en los niveles de transcrito en dichos fondos genéticos mutantes.

Primero, el estudio mediante *Northern-blot* de la expresión de los alelos mutantes *flbB100* (G456A; causando la sustitución Gly70Arg en la proteína) y *flbB102* (C1255T, $\Delta 1257$;

causando la sustitución Pro305Leu y un cambio en el marco de lectura en la posición 306 de la proteína seguida por una señal “stop”) (Etxebeste *et al.*, 2008) mostró que ésta sufría una notable represión en comparación con la forma silvestre, siendo destacable la ausencia del pico de expresión característico de *flbB* 4-6 h después de la inducción de la conidiación (Herrero-García, 2013). Resultados similares fueron obtenidos tras mutar el codón que codifica la metionina iniciadora de FlbB a ATC, la cual no debería afectar a la expresión pero, sí a la traducción debido a la sustitución Met1Ile. En segundo lugar, la concentración de las quimeras truncadas en el extremo C-terminal GFP::FlbB (1-361), (1-341), (1-321) y (1-294) fue marcadamente inferior a la concentración de la forma silvestre, siendo imposible detectar dichas formas en experimentos de *Western-blot* o microscopía de fluorescencia (Herrero-García *et al.*, 2015). También se observó el mismo efecto sobre los niveles de proteína FlbB en los mutantes puntuales C382A y (L104A; E105A) (Herrero-García *et al.*, 2015). En estos últimos casos no se puede descartar algún problema con la traducción o procesamiento de la proteína, por lo que se debería realizar una verificación de la expresión por *Northern-blot*. En cualquier caso, todos estos resultados llevaron a plantear la posibilidad de que FlbB pudiera regular por unión directa a su promotor (conjuntamente con FlbD o no) su propia expresión y, en consecuencia, los niveles de proteína y su actividad. En este sentido, se localizó una secuencia TTACCTAT en las coordenadas -424 a -432 del promotor de *flbB* (Herrero-García, 2013), la cual, es parecida a la secuencia PLD (TTACGTAA), diana definida para los FFTT tipo bZIP de la familia AP-1 (Toda *et al.*, 1992) y unida *in vitro* por el dominio bZIP de FlbB (Etxebeste *et al.*, 2009a).

Sin embargo, el mapeo de las lecturas de RNA-seq en el locus *flbB* (visualización a través del software IGV; Broad Institute) indica claramente que en ausencia de actividad FlbB (y por consiguiente ausencia también de actividad FlbD; (Garzia *et al.*, 2010)) existe un inicio de la transcripción y que la secuencia 5' del mRNA, incluida la presencia de un intrón, se mantiene con respecto al fondo genético silvestre (Figura 3.5). Estas observaciones sugieren que deben

ser otros FFTT los que unan al promotor de *flbB* y controlen su transcripción, y que los efectos descritos en esta sección se deben a otras causas que serán planteadas en la Discusión de este capítulo.

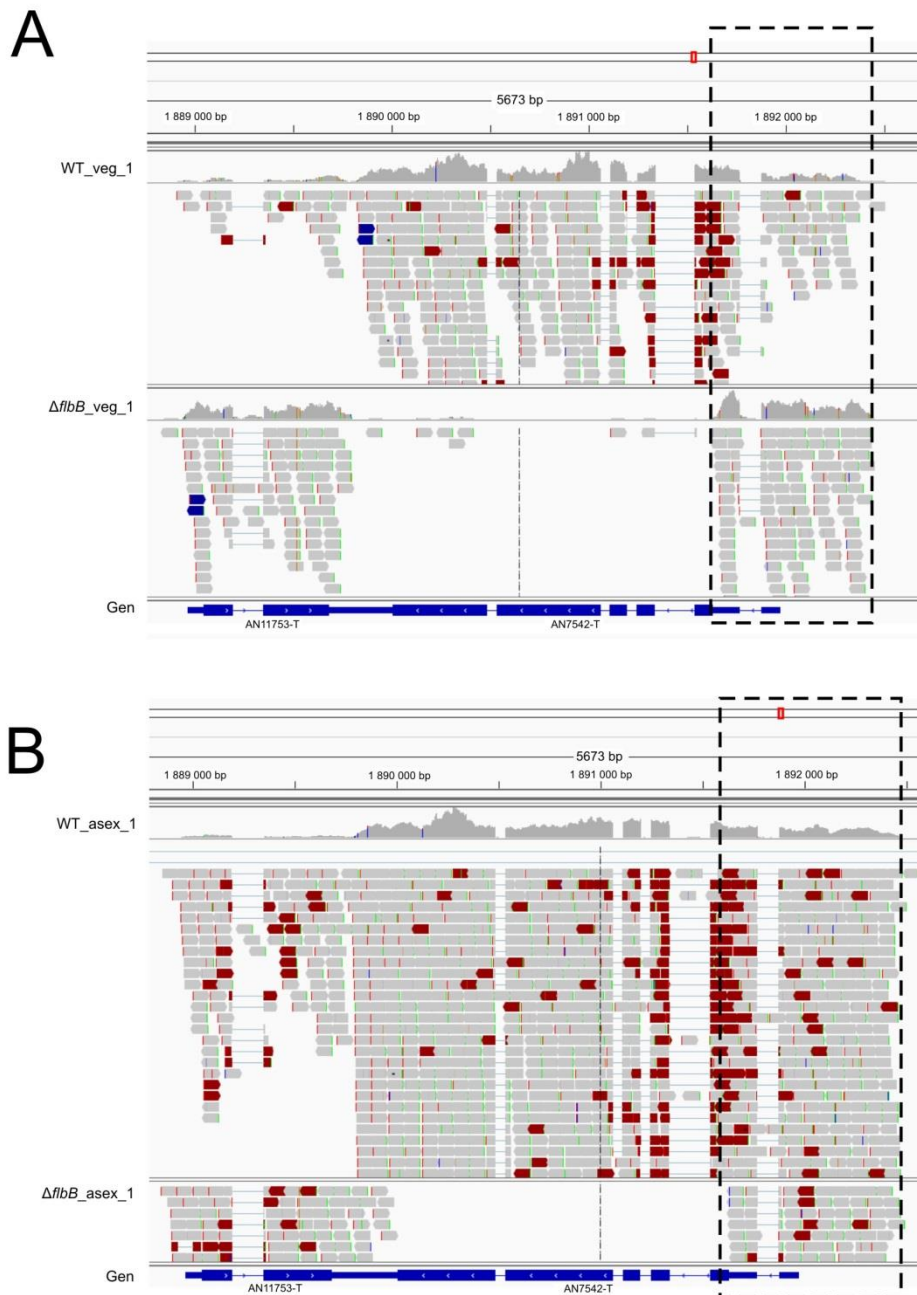


Figura 3.5. Mapeo de las lecturas de secuenciación en el locus *flbB*. La transcripción de *flbB* es iniciada en la cepa $\Delta flbB$ tanto en VG (A) como en AD (B). Los recuadros negros señalan la región 5'-UTR del mRNA.

4.- Discusión.

Los FFTT se han clasificado típicamente como "activadores" o "represores" según induzcan o repriman la expresión de sus genes diana. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un número significativo de ellos puede realizar una función dual, actuando como activadores o represores dependiendo del contexto (organización del promotor, presencia de co-reguladores, etcétera) o señal (fosforilación, por ejemplo) que determine en cada momento su actividad (Boyle y Despres, 2010). En este sentido, el experimento de RNA-seq ha permitido obtener una perspectiva general del efecto principalmente represor pero también inductor que la ausencia de actividad FlbB tiene sobre la expresión génica y determinados procesos celulares.

Además, la secuenciación de los transcriptomas de la cepa silvestre y el mutante $\Delta flbB$, junto con el análisis de los términos GO, han permitido identificar los procesos de oxido-reducción como los aparentemente más desregulados en ambas comparaciones realizadas. En el caso de la fase AD, dicha desregulación podría deberse a una hipotética relación entre las proteínas necesarias para neutralizar el ambiente oxidante que predomina al inducirse el desarrollo asexual mediante la exposición de los cultivos al aire y los reguladores de la diferenciación (FlbB). Previamente, varios autores sugirieron que las alteraciones en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en los procesos de diferenciación, en general, y el desarrollo en hongos filamentosos, en concreto (Aguirre *et al.*, 2005; Holmstrom y Finkel, 2014; Vargas-Perez *et al.*, 2007). El hecho de que el término GO más abundante entre los genes significativamente desregulados en fase AD en una cepa silvestre sea el de oxido-reducción (Garzia *et al.*, 2013) apoya esta posibilidad.

Sin embargo, los procesos de oxido-reducción también parecen verse fuertemente afectados en fase VG en el fondo $\Delta flbB$, lo cual podría indicar que 1) dichas reacciones son necesarias para el mantenimiento de procesos celulares específicos requeridos durante el

crecimiento vegetativo, o 2) que mediante la inducción de la expresión de los genes correspondientes las hifas vegetativas están preparadas para los cambios oxidativos y morfológicos que puedan ocurrir. En cuanto al primer caso, debe recordarse que el mutante nulo de *flbB* no muestra alteraciones aparentes en el crecimiento o integridad de las células vegetativas en cultivo líquido estándar o bajo condiciones de estrés salino (el único cambio descrito es una ligera mayor ramificación; (Etxebeste *et al.*, 2009a)). Por ello, se podría proponer que al igual que las proteínas UDA están presentes en fase vegetativa y parecen señalar la conidiación durante esta fase (Etxebeste *et al.*, 2009a; Garzia *et al.*, 2009; Garzia *et al.*, 2010; Herrero-García *et al.*, 2015), los genes y procesos celulares controlados por ellos también podrían estarlo. Aunque a falta de experimentos que lo confirmaran, los resultados del RNA-seq apoyarían esta relación. Por ejemplo, el gen *catA* de la ruta HogA/SakA de respuesta a estrés, el cual codifica una catalasa (Navarro y Aguirre, 1998), presenta una expresión significativamente reprimida en una cepa silvestre en la fase AD respecto a la fase VG (Garzia *et al.*, 2013) pero posteriormente aumenta de nuevo en las etapas finales de la producción de conidios y en conidios maduros (Navarro *et al.*, 1996; Navarro y Aguirre, 1998). Además, en la fase VG, hay una represión significativa de su transcripción en ausencia de *flbB*. En cualquier caso, el análisis de estas hipótesis requeriría, en primer lugar, confirmar dicha desregulación y, en segundo lugar, estudiar su posible relación con la ruta UDA.

El RNA-seq también ofrece la posibilidad de cuantificar, a través de los valores FPKM, los niveles de expresión de cada gen y comparar dichos niveles en diferentes fondos genéticos o puntos del ciclo de vida. Ello a su vez, permite priorizar aquellos genes con los mayores cambios de expresión (\log_2FC), generando las tablas Top. Dichas tablas han permitido centrar el análisis en el papel de FlbB en la regulación de (1) *cluster* de MMSS y (2) los genes del desarrollo. En el primer caso, los resultados sugieren que la represión del desarrollo asexual provoca un cambio en la expresión de *cluster* metabólicos específicos. Sin embargo, al menos

en los *cluster* aquí estudiados, no ha podido establecerse ninguna relación entre ambos procesos celulares (Chiang *et al.*, 2008; Yaegashi *et al.*, 2013). Una característica interesante de los metabolitos ligados a estos *cluster* de genes fue, no obstante, que habían mostrado actividad antimicrobiana (Emericelamida A) y antiproliferativa (Aspernidina A) (Oh *et al.*, 2007; Scherlach *et al.*, 2010). En el caso particular de la Emericelamida A, además, la síntesis del metabolito se identificó en respuesta a un co-cultivo entre las especies *E. parvathecia* y *S. Arenicola* (Oh *et al.*, 2007).

En cuanto a los genes que codifican reguladores del desarrollo asexual, el modelo genético descrito previamente por nuestro grupo fue sustentado por los resultados obtenidos en este trabajo (Garzia *et al.*, 2010). El RNA-seq confirmó que la ausencia de FlbB resulta en una represión de la expresión de *brlA* después de la exposición de las hifas al aire (Wieser *et al.* 1994) y *flbD* permanece como el principal gen de la ruta UDA que muestra una dependencia de la actividad transcripcional de FlbB (Tabla 3.2). Sin embargo, el RNA-seq también aportó nuevos datos acerca de la ruta UDA, indicando que *flbD* quizás no sea el único gen de la ruta controlado por FlbB. Se observó que la ausencia de la actividad FlbB afecta a la expresión de los genes *afeA* y *tmpA*, que son parte de una misma vía relacionada con la síntesis de una señal extracelular de esporulación (Soid-Raggi *et al.*, 2016). Esta ruta se ha definido como independiente a la de *fluG* (Soid-Raggi *et al.*, 2006; Soid-Raggi *et al.*, 2016). Sin embargo, los mutantes de los genes *flb* son capaces de complementar extracelularmente la deficiencia en el metabolito de señalización relacionado con FluG, por lo que se propuso que los factores Flb eran parte de la misma ruta de señalización de la conidiación que FluG (Etxebeste *et al.*, 2008; Lee y Adams, 1996; Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). De confirmarse, nuestros resultados de secuenciación sugerirían que al menos genéticamente sí hay una relación entre ambas rutas de señalización, las definidas por TmpA-AfeA y FluG-Flbs. También se identificó un gen, *An4394*, cuyos ortólogos están, según las bases de datos, implicados en el control del desarrollo

asexual. Ello ampliaría el rango de posibles dianas genéticas de la actividad FlbB. Una primera caracterización funcional de *An4394* se presenta en el siguiente capítulo.

Finalmente, un análisis detallado de las lecturas del RNA-seq y el inicio de la transcripción de *flbB* permite especular sobre la importancia que tiene la funcionalidad de FlbB sobre sus propios niveles de expresión y/o proteína. Inicialmente, los resultados obtenidos en el estudio de mutantes puntuales de FlbB o con truncamientos en su extremo C-terminal llevaron a plantear la posibilidad de un mecanismo de autorregulación transcripcional por unión directa del FlbB a su propio promotor. El análisis de los datos de secuenciación de RNA indicó, no obstante, que hay inducción de la expresión de *flbB* en el fondo genético $\Delta flbB$, por lo que esta posibilidad fue descartada, al menos como mecanismo principal de control de su expresión. Así, la existencia de mutaciones específicas en *flbB* que causan una profunda disminución de la concentración de proteína mientras que la transcripción es todavía detectable (Herrero-García *et al.*, 2015), llevaron a analizar otras vías posibles de regulación, entre ellas la presencia de uORFs (del inglés, *upstream open reading frame*). Los uORFs son ORFs localizados generalmente en la región 5' del mRNA y compuestos por un codón de iniciación (μ AUG), como mínimo un codón adicional y un codón de terminación (Barbosa *et al.*, 2013; Hood *et al.*, 2009). La presencia de uORFs en un *locus* determinado se correlaciona con una menor eficiencia de traducción y ratios proteína/mRNA significativamente más bajos (Calvo *et al.*, 2009). Estos efectos son consecuencia de la regulación que los uORFs pueden realizar sobre la estabilidad del mRNA o su traducción (Baker y Parker, 2004; Hood *et al.*, 2009).

Por ejemplo, *brlA* presenta un uORF en su promotor, el cual, juega un papel relevante en el control de su transcripción y, portanto, del desarrollo asexual en *A. nidulans* (Han *et al.*, 1993). De forma similar, los uORFs también podrían jugar un papel importante en el control de la concentración de FlbB, constituyendo un nuevo ejemplo de este tipo de mecanismo de regulación. El Dr. M.S. Cortese identificó, mediante un buscador de ORFs

Modificaciones en el perfil de expresión génica de *A. nidulans* causadas por la ausencia del factor de transcripción FlbB.

(http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html), dos codones de inicio en el promotor de *flbB*. Cada uno de ellos tiene un codón stop situado en fase 14 y 10 codones aguas abajo, respectivamente. El segundo uORF se sitúa en el intrón del promotor. Por lo tanto, este segundo uORF no participaría en la regulación del transcrito o la proteína a no ser que ese intrón se transcribiera en algún momento del desarrollo. Además, mediante la herramienta bioinformática <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>, se predijo una estructura secundaria de horquilla en el primero de los supuestas uORFs, por lo que podría bloquear al ribosoma y con ello la traducción del ORF principal (no mostrado). De confirmarse, este mecanismo aumentaría la complejidad del control de la síntesis FlbB y sugeriría que puede ser regulada a nivel de traducción. Estos mecanismos podrían limitar la relación proteína/mRNA de FlbB, ajustándola, por ejemplo, a la cantidad disponible de FlbE y limitando la cantidad de complejo FlbB/FlbE que pueda llegar a la punta de las hifas vegetativas y señalar allí la conidiación (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).

La funcionalidad de estos supuestos uORFs podría ser evaluada a través de dos estrategias principales. En primer lugar, se podría analizar mediante *Northern-blot* la expresión de cada secuencia uORF de *flbB* durante la inducción y progreso del desarrollo asexual, permitiendo conocer en qué fase del desarrollo pudiera ser necesario cada uORF (Rodríguez-Romero *et al.*, 2015). En segundo lugar, la delección de cada uORF y el análisis del fenotipo de las cepas correspondientes también contribuirían a conocer su importancia en el control de los niveles de FlbB. Este estudio se completaría con el análisis de los niveles de transcrito y proteína de FlbB, FlbD y BrIA, así como el análisis de la localización subcelular y dinámica de FlbB.

Desregulación del metabolismo secundario y el desarrollo sexual en ausencia de actividad de FlbB.

1.- Introducción.

El análisis general de los resultados de secuenciación de RNA presentado en el capítulo anterior permitió centrar el estudio en aquellos *cluster* del metabolismo secundario y genes implicados en el control del desarrollo que estuvieran más significativamente desregulados. Cuatro fueron los *cluster* metabólicos principalmente desregulados en ausencia de *flbB*. De ellos, aquellos que abarcan los genes *An2030-An2038* (Ahuja *et al.*, 2012; Bromann *et al.*, 2012) y *An7893-An7903 (dba)* (Gerke *et al.*, 2012; Schroeckh *et al.*, 2009) se estudiarán más detalladamente en este capítulo, centrando su análisis en un hipotético papel en la inducción o control de la conidiación o la posible síntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana. En cuanto al desarrollo se refiere, el capítulo anterior se centró en identificar posibles dianas de la actividad transcripcional de FlbB dentro de las rutas UDA y CDP, así como en la interpretación de los resultados obtenidos tomando como referencia los modelos genéticos previamente existentes. El análisis permitió la identificación de *An4394* como un gen que podría ser necesario para ejercer una regulación positiva de la esporulación asexual. En este capítulo se presenta un primer estudio funcional de dicho gen.

2.- Caracterización de los *cluster* génicos *An2030-2038* y *dba*.

2.1. Estudio del *cluster An2030-2038*.

Los genes del *cluster An2030-2038* se hallaban entre los más inducidos (Top20) en ausencia de actividad FlbB en la fase VG (Tabla 3.1). Sin embargo, su patrón de expresión era completamente opuesto en la fase AD, siendo reprimidos en la cepa $\Delta flbB$. Dichos resultados sugerían que la actividad de FlbB podría reprimir, directa o indirectamente, la expresión del *cluster* en la fase VG y activarla en la fase AD, vinculando su actividad con la síntesis de un metabolito necesario para o durante el desarrollo asexual. La comparación de los

transcriptomas de la cepa silvestre en las fases VG y AD, donde se observaba una clara inducción de este *cluster* en AD (Garzia *et al.*, 2013), apoyaba esta posibilidad.

Análisis bioinformáticos complementaron los resultados de secuenciación para este *cluster*. Por un lado, la sintenia mostró que no se conserva en otras especies del género *Aspergillus* como *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. flavus* o *A. niger* (Figura 4.1A). Por otro lado, los Blast revelaron una alta conservación del *cluster An2030-2038* con otro de la especie fúngica *Metarhizium robertsii* (Figuras 4.1A y 4.1B), una especie endémica del suelo (Bidochka *et al.*, 2001). *M. robertsii* es un hongo entomatopatógeno (Lomer *et al.*, 2001; Sasan y Bidochka, 2012), pero también es endófito y estimula el desarrollo de la raíz de las plantas (Sasan y Bidochka, 2012). La conservación de cada gen del *cluster An2030-2038* se representó mediante árboles filogenéticos (Anexo 4) a partir de los cuales se conformó un sólo árbol emparejando aquellos genes del *cluster* de *A. nidulans* respecto a los de *M. robertsii* (Figura 4.1B).

En resumen, la ausencia del *cluster* en el genoma de otros hongos conidiantes del género *Aspergilli* sugiere que su actividad no es necesaria para la inducción de la conidiación o que, alternativamente, podría ser necesaria en etapas morfológicas que tienen lugar exclusivamente durante el desarrollo del conidióforo en *A. nidulans*, pero no en las especies incluidas en el análisis de la sintenia.

Antes de profundizar en el análisis funcional de este grupo de genes, se intentó confirmar su desregulación en el fondo genético $\Delta flbB$ mediante *Northern-blot*. No obstante, la hibridación con una sonda para *An2038* no pudo confirmar dicha desregulación al no hibridarse ésta correctamente (no mostrado). Por ello, se decidió delecionar el *cluster* completo con el objetivo de realizar un estudio preliminar sobre su posible relación con la conidiación.

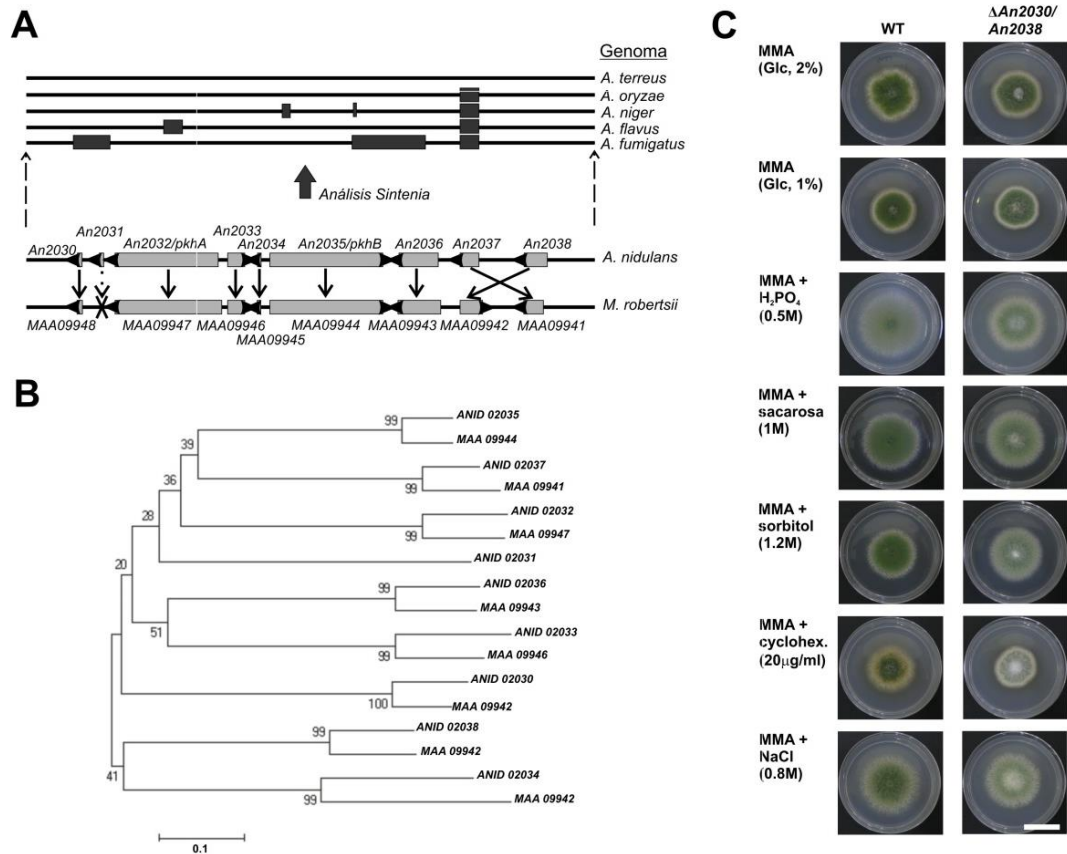


Figura 4.1. Análisis de la conservación del *cluster* metabólico *An2030/An2038* y análisis del fenotipo generado por la delección del mismo (Δ *An2030-An2038*). A) La parte superior muestra los resultados del análisis de la sintenia, obtenidos a partir de la base de datos *Aspergillus Comparative Database*. En este análisis se puede observar la ausencia del *cluster* en otras especies del género *Aspergillus*. Los cuadrados grises oscuros representan las regiones del genoma de *A. nidulans* conservadas en los genomas de *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. La parte inferior presenta los resultados de los análisis de la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), obtenidos según el algoritmo Blast, donde se observa la conservación del *cluster An2030-An2038* en el genoma de *M. robertsii*. B) Árbol filogenético (obtenido con el software Mega) emparejando los genes *An2030/2038* con sus ortólogos en *M. robertsii*. C) Fenotipo de la cepa Δ *An2030-An2038* (derecha) en comparación con el parental silvestre (izquierda) en MMA utilizando glucosa (1 y 2%), y MMA (glucosa) con H₂PO₄⁻ (0.5 M), sacarosa (1 M), sorbitol (1.2 M), NaCl (0.8 M) o cicloheximida (20 μg/mL) como condiciones de estrés. Barra de escala = 2 cm.

Para la generación de la cepa Δ *An2030-2038* se siguió el protocolo del apartado 5.1 del capítulo 2 (Figura 2.1A). El fragmento sintético a transformar contenía el promotor (5' -UTR) de *An2038* y el terminador (3' -UTR) de *An2030* fusionados al marcador de auxotrofia *pyrG^{Afum}*. La construcción se utilizó para transformar protoplastos de una cepa silvestre (Yang *et al.*, 2004). El fenotipo transformante se analizó en MMA y se comparó con el de la cepa silvestre, sin

llegar a observarse cambios significativos en la producción de conidios en condiciones de estrés osmótico o salino, ni en MMA con cicloheximida (de Souza *et al.*, 1998; Hellauer *et al.*, 2002), un inhibidor de la traducción de mRNA producido por la bacteria *Streptomyces griseus* (Figura 4.1C).

Considerando los resultados obtenidos, no se pudo asociar la actividad del *cluster* An2030-An2038 directamente a la biogénesis del conidióforo o a la respuesta a las condiciones de estrés analizadas en este trabajo.

2.2. La inducción de la expresión del *cluster* metabólico *dba* aumenta la viabilidad de *A. nidulans* ante la bacteria *M. luteus*.

Los resultados del RNA-seq indicaron que los genes del *cluster dba* se hallaban entre aquellos significativamente más inducidos en ausencia de FlbB, tanto en fase VG como AD (ver Tablas Top20 en capítulo anterior). Además, todos los genes del *cluster* estaban incluidos en el perfil de expresión PE1 (Figura 3.3D), el cual agrupaba genes en los que la expresión aumentaba significativamente en un fondo $\Delta flbB$ en ambas fases de crecimiento, pero sobre todo en la fase AD. Por todo ello, se decidió profundizar en su análisis.

2.2.1. Conservación del *cluster dba*.

Los estudios iniciales se centraron en el análisis bioinformático de la conservación del *cluster dba*. De hecho, la extensión del *cluster* se redefinió en base a los resultados *in silico* que se muestran a continuación. Éstos modifican lo descrito por (Gerke *et al.*, 2012), quienes definieron que el *cluster dba* abarcaba los genes entre An7896 y An7903. En este caso, se incluyen en los análisis los genes entre An7893 y An7903.

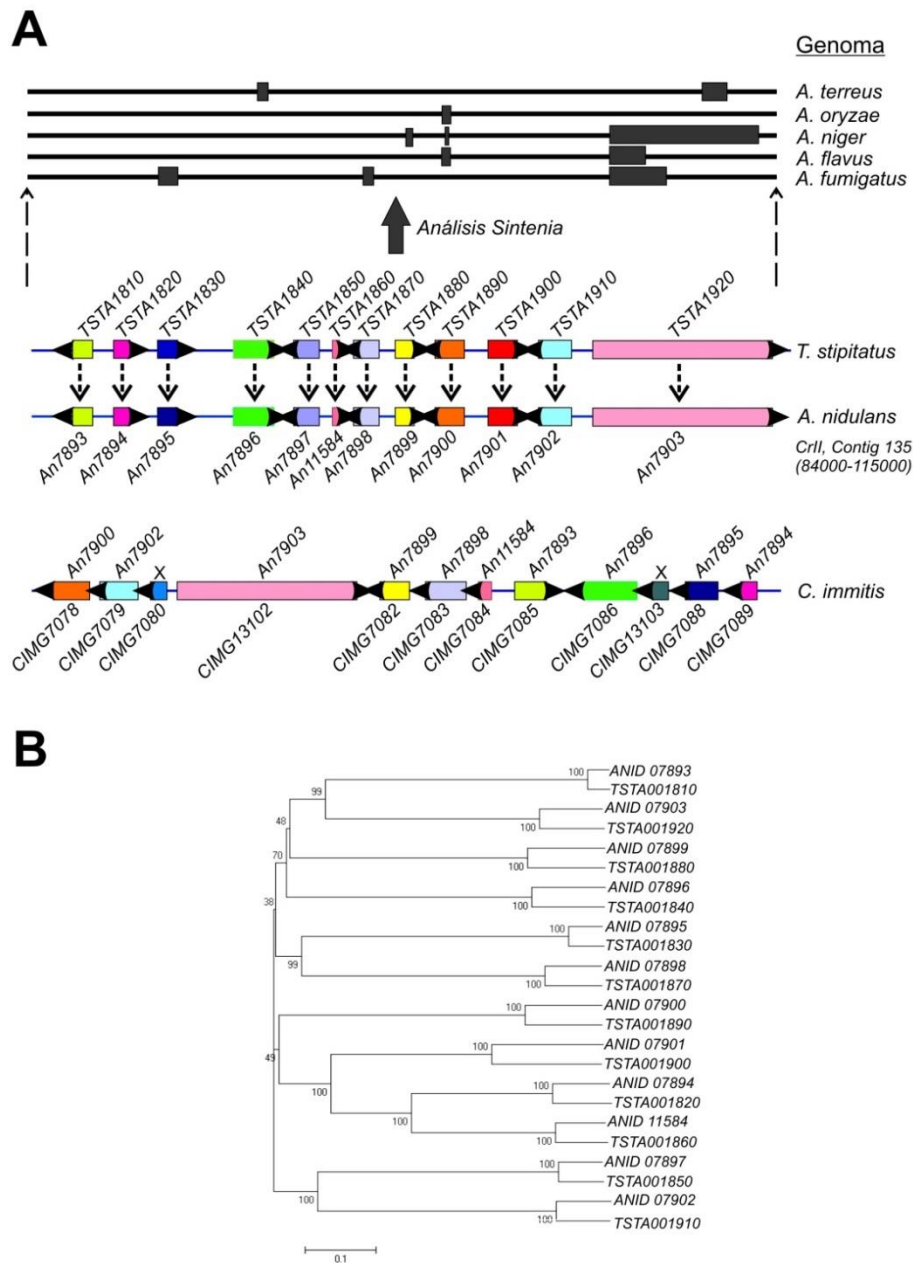


Figura 4.2. Análisis bioinformático de los genes del *cluster dba*. A) La parte superior muestra la ausencia del *cluster* en otras especies del género *Aspergillus* como *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, y *A. fumigatus*. Las regiones conservadas del genoma de *A. nidulans* fueron representadas mediante cuadrados grises. La parte inferior del panel presenta los resultados de los análisis Blast, con la conservación total del *cluster dba* en el genoma de *T. stipitatus* y una conservación parcial en el genoma de *C. immitis*. B) Análisis filogenético (software MEGA) que empareja los genes del *cluster dba* con los genes ortólogos de *T. stipitatus*.

El análisis de la sintenia mostró que el *cluster* no se conserva en otras especies del género *Aspergillus* (Figura 4.2A). Los Blast de cada gen del *cluster*, por otro lado, indicaron que

todos ellos conservan la posición y orientación respecto a sus ortólogos en otro *cluster* de *Talaromyces stipitatus*, un hongo del suelo que es caracterizado por su capacidad de secretar enzimas termoestables (Gruber *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2015) (Figura 4.2A). La conservación de cada gen del *cluster dba* se analizó mediante árboles filogenéticos (Anexo 5) a partir de los cuales se conformó un solo árbol emparejando cada uno con su ortólogo correspondiente de *T. stipitatus* (Figura 4.2B). También se hallaron *cluster* metabólicos en los patógenos humanos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* que contienen ortólogos de la mayor parte de los genes *dba*. Sin embargo, estos genes muestran una posición y orientación relativa diferente (Figura 4.2A).

2.2.2. Confirmación de la inducción del *cluster dba* en un fondo genético nulo en *flbB*.

Se confirmó mediante qPCR la inducción en la fase VG de los genes *An7895/cipB*, *An7896/dbaA* y *An7901/dbaG* (Figura 4.3A). *An7895/cipB* codifica una oxidorreductasa y es el gen Top1 de los genes inducidos en fondo genético $\Delta flbB$ en fase AD. *An7896/dbaA* y *An7901/dbaG*, por otro lado, son genes que codifican dos FFTT cuya función es regular la expresión del resto de genes del *cluster dba* (Gerke *et al.*, 2012). La expresión de los tres genes en la fase VG fue estudiada en los fondos genéticos silvestre, $\Delta flbB$ y también $\Delta fluG$ y $\Delta brlA$. De este modo, se comprobó que en estos mutantes UDA y CDP la expresión de los genes *dba* aumentaba (Figura 4.3A), ya que mostraban valores significativamente menores de $\Delta Ct (= Ct_{gen} - Ct_{referencia})$ respecto a la cepa silvestre ($P < 0.05$ en todos los casos).

Por otro lado, se utilizó la técnica de *Northern-blot* para seguir la expresión de los genes *An7895/cipB* y *An7898/dbaD* (este último codifica un supuesto transportador transmembrana) en distintos fondos genéticos (WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$ y $\Delta An4394$; ver más adelante) y a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 h) del desarrollo. Los resultados muestran que ambos genes son fuertemente desregulados en las cepas mutantes analizadas (Figura 4.3B). Es decir,

el aumento de la expresión de los genes *dba*, sobre todo en fase VG (0 h) y primeras fases de desarrollo asexual (6, 12 h), no ocurre únicamente en el fondo genético $\Delta flbB$, sino que se da también en las cepas $\Delta flbD$ y $\Delta An4394$ (Figura 4.3B). Los resultados sugieren que la inducción del *cluster dba* descrita inicialmente para el mutante nulo *flbB* no es específica de esta cepa, y es extensible a mutantes aconidiales en genes de la ruta UDA.

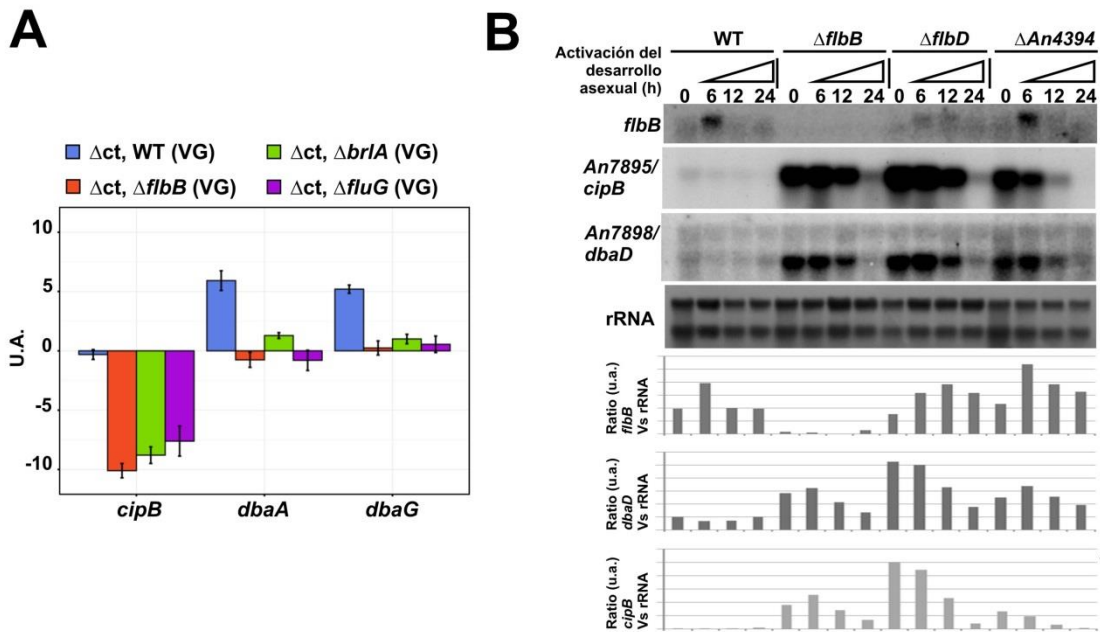


Figura 4.3. Expresión de los genes *dba*. A) Análisis qPCR de la expresión de los genes *An7895/cipB*, *An7896/dbaA* y *An7901/dbaG* en los fondo genéticos WT, $\Delta flbB$, $\Delta brlA$, y $\Delta fluG$. Los valores ΔCt ($= Ct_{gen} - Ct_{control}$) fueron calculados como valores medios de tres replicados junto con el error estándar de la media (*sem*, de sus siglas en inglés, *standard error of the meaning*). B) Experimentos *Northern-blot* mostrando la expresión de *flbB*, *An7895/cipB*, y *An7898/dbaD* en las cepas WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$, y $\Delta An4394/urDA$ y en diferentes etapas del desarrollo asexual. Los rRNAs se muestran como control de carga y los gráficos indican las relaciones entre el promedio de la intensidad de pixeles de cada banda de *Northern-blot* respecto a su correspondiente banda de rRNA (ribosomal grande). Las gráficas se obtuvieron con Microsoft Excel, y el promedio de la intensidad de pixel para cada banda fue calculado mediante Image Gauge (version 4.0; Fujifilm).

2.2.3. Estudio fenotípico de los mutantes nulos en los genes *dba*.

Se generaron mutantes nulos de los genes del *cluster dba* tanto en un fondo genético silvestre como en fondo $\Delta flbB$. Un primer análisis en MMA no mostró ninguna diferencia fenotípica en ninguno de los mutantes con respecto a sus parentales (Figura 4.4A), tampoco en

las condiciones de estrés osmótico (sacarosa 1 M, sorbitol 1.2 M) o salino (H_2PO_4^- 0.5 M) analizadas (no mostrado). Sin embargo, en MMA con cicloheximida se observaron diferencias fenotípicas significativas entre el parental $\Delta flbB$ y los dobles nulos $\Delta flbB;\Delta dba$ (Figuras 4.4B y 4.4C).

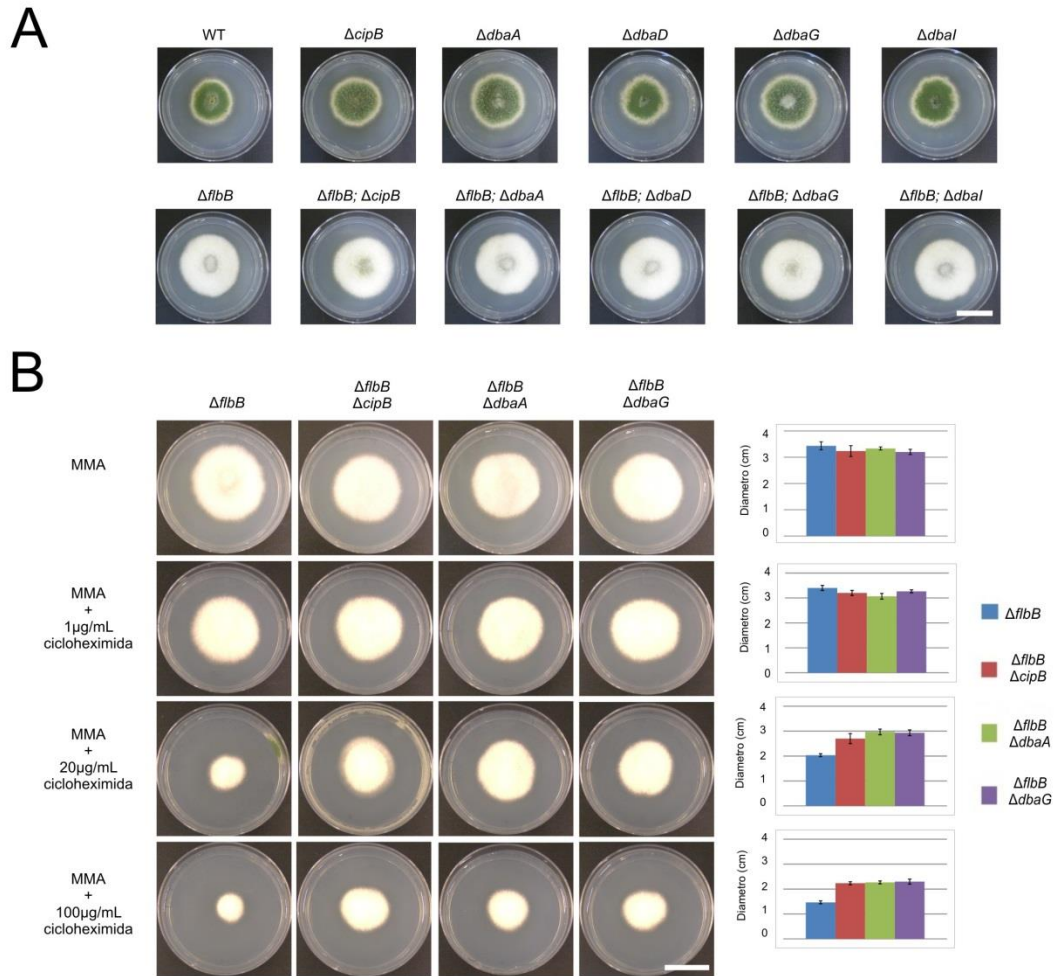


Figura 4.4. Caracterización fenotípica de los mutantes nulos en los genes del *cluster dba*. A) Fenotipos en MMA de los mutantes nulos en los genes *dba* tanto en el fondo genético silvestre como en $\Delta flbB$. B) Fenotipos y diámetro de las cepas $\Delta flbB$, $\Delta flbB;\Delta An7895$, $\Delta flbB;\Delta An7896$ y $\Delta flbB;\Delta An7901$ (en columnas) en MMA (fila superior) y MMA con concentraciones crecientes de cicloheximida (filas 2, 3 y 4). Barra de escala = 2 cm

La cicloheximida es un inhibidor de la traducción (Oshero y May, 2000) y su efecto respecto al *cluster dba* podría ser equivalente al generado por el mutante nulo $\Delta csnE$, donde la expresión de los genes *dba* está activada (Gerke *et al.*, 2012). CsnE es parte del signalosoma

COP9 (CSN), un complejo regulador de las ubiquitina ligasas, y su delección provoca cambios en el proteoma del hongo (Nahlik *et al.*, 2010). La Figura 4.4B muestra los fenotipos observados en medio con concentraciones crecientes de cicloheximida (1-100 µg/mL). Un aumento de concentración de este compuesto provocó la disminución del diámetro de la colonia en la cepa parental $\Delta flbB$. Sin embargo, los dobles nulos mostraron ser más tolerantes, de modo que al aumentar su concentración, la disminución del diámetro de la colonia era menor (Figura 4.4B). Concretamente, el diámetro en los dobles nulos respecto al parental $\Delta flbB$ fue aproximadamente un 33% mayor en medios con concentraciones de cicloheximida de 20 o 100 µg/mL ($P < 0.05$ en todos los casos; $n = 3$ para cada cepa). La figura muestra únicamente las cepas de fondo genético $\Delta flbB$ porque en este caso tampoco se observaron diferencias reseñables al comparar el parental silvestre y los correspondientes mutantes nulos en genes *dba*. Por lo tanto, los cambios fenotípicos observados podrían ser un efecto combinado de la ausencia de actividad UDA, la cual induce la expresión de los genes del *cluster*, y probable ausencia de actividad *dba* causada por la delección de genes del *cluster* (ver Discusión).

2.2.4. La viabilidad de *A. nidulans* ante la bacteria *M. luteus* aumenta como consecuencia de la expresión del *cluster dba*.

La caracterización realizada por (Gerke *et al.*, 2012) mostró que el *cluster dba* está implicado en la síntesis del MS 2,4-dihidroxi-3-metil-6-(2-oxopropil) benzaldehído (DHMBA). Este compuesto presenta actividad biológica contra *Micrococcus luteus* (Gerke *et al.*, 2012), una bacteria que se encuentra en el suelo, polvo, agua y aire, y en diversos tejidos y secreciones corporales (Young *et al.*, 2010).

Con la intención de analizar si la activación del *cluster dba* observada en el mutante $\Delta flbB$ podía ser biológicamente relevante en situaciones de competencia con la bacteria *M. luteus*, se realizaron co-cultivos de ambas especies. Para ello, las cepas $\Delta flbB$ y $\Delta flbB; \Delta dba$ se cultivaron con *M. luteus*, inoculando cantidades relativas variables de conidios de *A. nidulans* y

células bacterianas (ver apartado 9 en capítulo 2, Figura 2.3). Se seleccionaron las relaciones óptimas para el estudio de dicha competencia. En la Figura 4.5 se muestran los resultados correspondientes a las relaciones 0/1 (sin células bacterianas; control) y 25/1 (25 células bacterianas por cada conidio de *A. nidulans*). Después de 48 h de incubación, las hifas de la cepa $\Delta flbB$ colonizaron la superficie de agar y formaron hifas aéreas en la zona cultivada con *M. luteus* (punta de flecha negra en Figura 4.5). Por el contrario, las hifas de las cepas $\Delta flbB$; Δdba permanecieron mayormente sumergidas en esta zona. La concentración de células bacterianas en la región de co-cultivo con la cepa parental $\Delta flbB$ ($3.7 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$ células/cm²) fue 10 veces menor que en el caso de los dobles mutantes $\Delta flbB$; $\Delta dbaD$ y $\Delta flbB$; $\Delta dbaI$ ($2.9 \times 10^9 \pm 0.5 \times 10^9$ y $2.8 \times 10^9 \pm 0.7 \times 10^9$ células bacterianas/cm², respectivamente; $P < 0.05$; $n = 9$ para cada cepa; cambio significativo en ambas comparaciones). El experimento fue realizado con la mayoría de dobles mutantes $\Delta flbB$; Δdba , observándose fenotipos similares (Anexo 6). Los resultados obtenidos sugieren, por tanto, que la pérdida de actividad FlbB y UDA induce la expresión del *cluster dba*, resultando en un aumento de la actividad antibiótica, probablemente debida a una mayor producción de DHMBA.

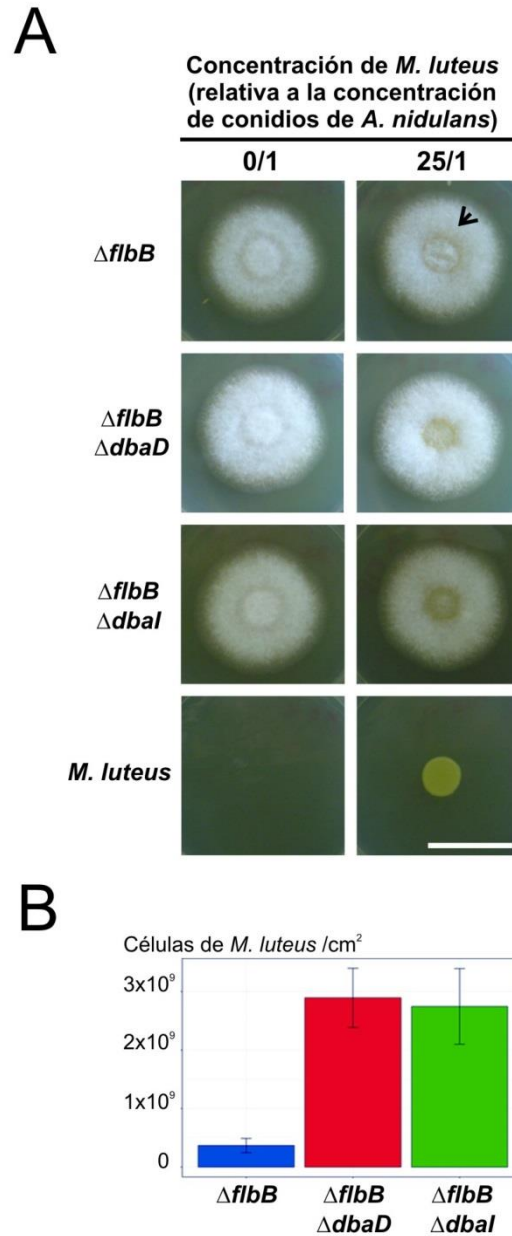


Figura 4.5. Co-cultivos de *A. nidulans* y *M. luteus*. A) Comparación fenotípica entre las cepas $\Delta flbB$ (línea 1), $\Delta flbB$; $\Delta dbaD$ (línea 2), y $\Delta flbB$; $\Delta dbal$ (línea 3) después de 48 h de cultivo junto con *M. luteus* en un medio LB apropiadamente suplementado. La punta de flecha negra indica la región de co-cultivo. Las relaciones entre las concentraciones de células bacterianas y conidios están indicadas, mostrando como controles las placas que no contienen o que contienen solamente el correspondiente inóculo de bacteria u hongo. Barra de escala, 2 cm. B) Promedio de número de células de *M. luteus* después de 48h de co-cultivo con los mutantes $\Delta flbB$ (azúl), $\Delta flbB$; $\Delta dbaD$ (rojo), y $\Delta flbB$; $\Delta dbal$ (verde). El gráfico ilustra la media de tres réplicas biológicas y nueve réplicas técnicas $\pm sem$.

3.- *flbB* es necesario para la correcta expresión de *An4394*, el cual codifica un supuesto FT de tipo bHLH que inhibe el desarrollo sexual.

3.1. *An4394* es un regulador temprano del desarrollo asexual.

La transcripción de *An4394* se reprime fuertemente en el fondo genético $\Delta flbB$, tanto en fase VG (Tabla 3.1, Top20) como en AD, por lo que fue incluido dentro del perfil de expresión PE2 junto con *flbD* (Figura 3.3E). Para obtener más información en torno a *An4394*, se acudió a la base de datos AspGD (www.aspgd.org). La secuencia predicha coincidió con la obtenida en el experimento de RNA-seq. Además, la base de datos indicaba que los ortólogos de *An4394* estaban involucrados en la regulación positiva del desarrollo asexual (Tabla 3.1, Top20). Concretamente, su ortólogo en *A. oryzae*, *EcdR* (gen AO090023000902), es un FT del tipo bHLH (de las siglas en inglés: *basic helix-loop-helix*) que actúa como regulador temprano del desarrollo asexual (Jin *et al.*, 2011a).

Los alineamientos de secuencia entre *An4394* y *EcdR* (43.1% de identidad global de acuerdo con (Jin *et al.*, 2011a)) mostraron que la homología no sólo se limita al supuesto dominio bHLH de *EcdR* (flechas negras en la Figura 4.6A), cuya extensión abarca los residuos 150-211 (Jin *et al.*, 2011a). Los residuos conservados se extienden a lo largo de toda la proteína, lo cual es confirmado por el alineamiento de *An4394* con ortólogos de distintas especies fúngicas (Figura 4.6B). Además, la sintenia indicó que el *locus An4394* estaba conservado en regiones equivalentes del genoma de otras especies del género *Aspergilli* (no mostrado). Estos resultados preliminares sugerían una relación de *An4394* con el control del desarrollo asexual. Por ello, se decidió profundizar en su estudio.

3.2. La expresión del gen *An4394* se reprime en los mutantes UDA.

La expresión del gen *An4394* fue estudiada en diversos fondos genéticos (WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbE$, $\Delta flbD$, $\Delta gmcA$, y $\Delta brlA$) y fases del desarrollo mediante experimentos de *Northern-blot* (Figura 4.7). Primero, el análisis se centró en la cepa silvestre, donde los resultados mostraron que había un aumento en su expresión después de la inducción de la conidiación (6h), seguido por una represión a las 24 y 48 h (Figura 4.7A). Sin embargo, a diferencia de los resultados del RNA-seq, no se detectó transcripción de *An4394* en fase VG (0 h). Esta observación coincide con los resultados descritos por Sibthorp y colaboradores, que describieron valores bajos de RPKM (lecturas por Kilobase de exón por Millón de fragmentos mapeados) para *An4394*, tanto en MMA como en MCA (Sibthorp *et al.*, 2013). La baja expresión de *An4394* en fase VG fue apoyada también por la incapacidad de detectar la quimera *An4394::GFP* en hifas vegetativas (Figura 4.7C) o en experimentos de *Western-blot* (no mostrado). Esta quimera presentó una localización nuclear en estudios de microscopía de fluorescencia únicamente después de inducir la conidiación, pero no se pudo asociar dicha localización a un tipo celular específico (Figura 4.7C). En cualquier caso, estos resultados preliminares sugieren que la expresión de *An4394* es baja en fase VG y, por lo tanto, se aceptó el resultado del *Northern-blot* como correcto.

La misma imagen (Figura 4.7A) confirma la represión de la expresión de *An4394* en la cepa $\Delta flbB$, observándose asimismo que dicha represión se mantenía en otros mutantes nulos de genes UDA como *flbE*, *flbD*, y *gmcA* (Etxebeste *et al.*, 2012) (Figura 4.7B). Sin embargo, la transcripción de *An4394* aumenta en el fondo $\Delta brlA$, sugiriendo que mientras la vía UDA induce la expresión de *An4394*, la vía CDP participa en su represión. No se ha profundizado en esta posibilidad. Finalmente, el mantenimiento del pico de expresión de *flbB* en una cepa $\Delta An4394$ en comparación con la cepa parental silvestre (ver Figura 4.3B) confirmó que *An4394* se encuentra corriente abajo de los genes *flb* en la ruta UDA.

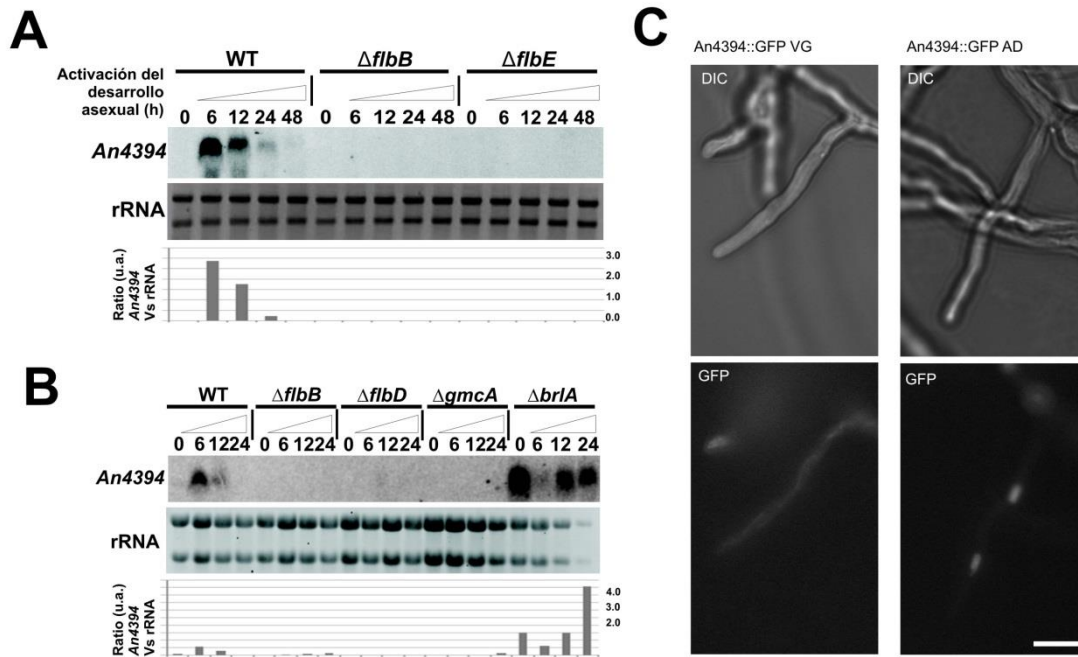


Figura 4.7. Regulación de la expresión de *An4394* y localización de la quimera *An4394::GFP*. A) *Northern-blot* mostrando la expresión del gen *An4394* en los fondos genéticos silvestre, $\Delta flbB$ y $\Delta flbE$. B) *Northern-blot* mostrando la expresión de *An4394* en los fondos genéticos silvestre, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$, $\Delta gmcA$, y $\Delta brlA$. C) Localización subcelular de *An4394::GFP* antes y después de inducir el desarrollo asexual. Barra de escala = 5 μ m.

3.3. *An4394* es un regulador de los ciclos de desarrollo asexual y sexual.

El papel del gen *An4394* en el desarrollo fue analizado mediante la caracterización fenotípica de su mutante nulo (Figura 4.8A). La delección de *An4394* se realizó tanto en fondo genético silvestre como en fondo $\Delta flbB$. La producción de conidios de la cepa $\Delta An4394$ ($3.6 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^5$ conidios/cm²) fue 27 veces menor que la de la cepa parental silvestre ($9.6 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$ conidios/cm²) (Figura 4.8A, 48 h y 72 h, y 4.8B, arriba). En cuanto al desarrollo sexual, se observó un inicio prematuro del proceso respecto a la cepa silvestre (Figura 4.8A), con una producción abundante de células Hülle después de sólo 4 días de cultivo a 37°C (Figura 4.8A, 96h). Después de 7 días, el mutante nulo de *An4394* produjo cleistotecios maduros que contenían ascosporas viables (2515 ± 157 cleistotecio/cm²) (Figura 4.8B, abajo y 4.8C), las cuales, germinaron y fueron capaces de crecer (ver el recuadro en la Figura 4.8C

correspondiente a 48 h de cultivo de ascosporas en MMA a temperatura ambiente). La cepa parental silvestre también había iniciado el desarrollo de cleistotecios después de 7 días de cultivo (478 ± 67 cleistotecios/cm²) (Figura 4.8B, parte inferior). No obstante, estas estructuras sexuales eran inmaduras y no contenían ascosporas (no mostrado).

Se confirmó que el fenotipo de la cepa $\Delta An4394$ era causado exclusivamente por la deleción de este gen al observar que la inserción del alelo silvestre del gen en su propio *locus* (apartados 5.2 y 5.3 del capítulo 2) causaba la recuperación del fenotipo silvestre y los niveles de expresión de *An4394* (Figura 4.8D, 4.8E). Considerando el papel UDA-dependiente de *An4394* en la regulación del desarrollo en *A. nidulans*, se decidió utilizar la designación Urda (*UDA-dependent regulator of development in A. nidulans*) (Oartzabal-Arano *et al.*, 2015).

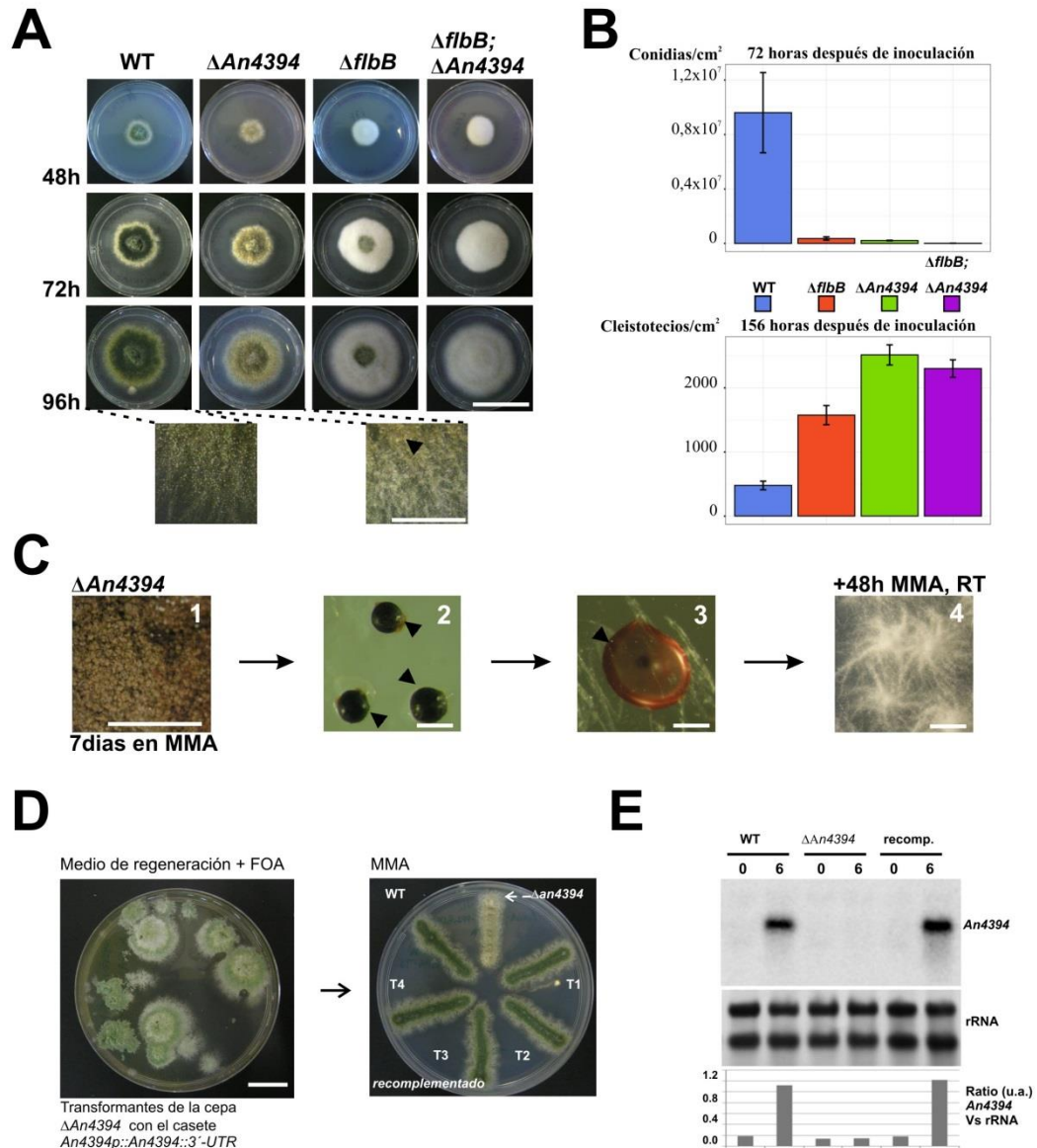


Figura 4.8. Caracterización funcional de *An4394*. A) Fenotipo del mutante $\Delta An4394$ en MMA después de 48, 72 y 96 h de cultivo a 37°C. Barra de escala, 3 cm. Los aumentos muestran el elevado número de células Hülle producidos por el mutante nulo de *An4394* (punta de flecha negra, derecha) en comparación con la cepa silvestre (izquierda) después de 96 h de cultivo. Barra de escala, 0.2 cm. B) Producción de conidios y cleistotecios de las cepas parentales (WT y $\Delta flbB$) y mutantes nulos de *An4394* en ambos fondos genéticos en placas de MMA después de 72 y 156 h de cultivo a 37°C, respectivamente. Los valores son la media de tres réplicas más *sem*. C) (1) Fenotipo del mutante nulo *An4394* después de 7 días de cultivo en MMA. (2) Los cleistotecios fueron aislados, (3) lisados mecánicamente, y las ascosporas se cultivaron en MMA durante 48h adicionales a temperatura ambiente. (4) Fenotipo de las colonias de $\Delta An4394$ germinadas a partir de las ascosporas. Barras de escala, (1) 0.2 cm; (2) 100 μ m; (3) 0.3 mm; (4) 3 mm. D) Fenotipo de los transformantes de la cepa $\Delta An4394$ en los que se ha integrado una copia silvestre de *urdA*. Se muestran imágenes correspondientes a placas de medio de regeneración que contienen FOA (izquierda) o carecen de él (derecha) Barra de escala, 2.5 cm. E) Experimento de *Northern-blot* mostrando la recuperación del nivel de expresión de *An4394* en una de las cepas revertientes.

3.4. La expresión de *nsdD* en el mutante nulo de *urda* no varía significativamente.

El modelo de control genético del desarrollo en *A. nidulans* presentado por (Lee *et al.*, 2014) proponía que los factores Flb activan la conidiación desplazando a la proteína NsdD del promotor de *brlA*. Es decir, (Lee *et al.*, 2014) propusieron que, además de ser un regulador positivo de la producción de cleistotecios (Han *et al.*, 2001), NsdD tenía una función inhibidora de la conidiación. La delección de *urda* provocaba efectos fenotípicos opuestos a la delección de *nsdD*, por lo que se analizó la posibilidad de una hipotética inducción de la expresión de *nsdD* en el mutante nulo de *urda*. Ello podría apoyar la interpretación de que UrdA y la ruta UDA reprimiesen la transcripción de *nsdD*. Con este objetivo se realizaron nuevos experimentos de *Northern-blot*. Por un lado, se analizó la expresión de *urda* durante el desarrollo sexual (SD; de las siglas en inglés; *sexual development*), sin que el transcrito correspondiente pudiera ser detectado (Figura 4.9A). Este resultado sugiere que UrdA no juega un papel relevante en la formación de los tipos celulares que componen los cleistotecios. Por otra parte, no se observaron diferencias notables en los niveles de expresión de *nsdD* en el fondo genético $\Delta urdA$ (Figura 4.9B) (la hibridación de la sonda *brlA* se utilizó como control). Por ello, se concluyó que la expresión de *nsdD* no está sujeta al control de *urda* y que la activación prematura del desarrollo sexual que se describió para el mutante nulo de *urda* no era consecuencia de una inducción temprana de *nsdD*.

En resumen, los resultados sugieren que *urda* codifica un FT situado aguas abajo de los Flb-s en la vía de inducción del desarrollo asexual y que se requiere no sólo para el correcto desarrollo de conidióforos, sino también para la inhibición del desarrollo sexual.

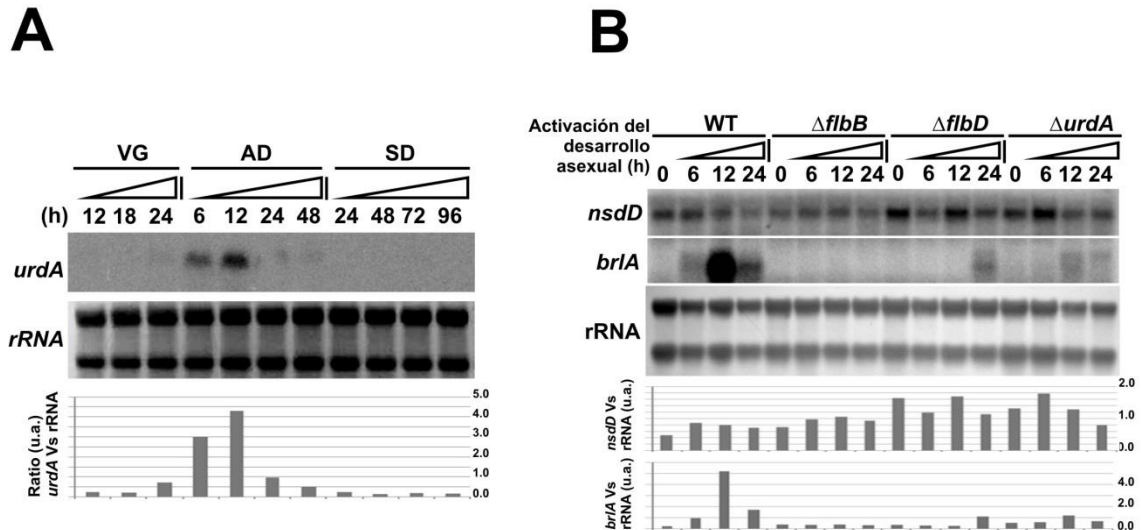


Figura 4.9. Expresión de *urdA* y *nsdD* durante morfogénesis y desarrollo. A) Expresión de *urdA* durante el crecimiento vegetativo (12, 18, y 24 h, VG), así como en los ciclos de desarrollo asexual (6, 12, 24, y 48 h, AD) y sexual (24, 48, 72, y 96 h, SD). B) Expresión de *brIA* y *nsdD* en las cepas WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$, y $\Delta An4394/urdA$, 0, 6, 12 y 24 horas después de la inducción del desarrollo asexual.

4.- Discusión.

Los resultados de este capítulo han confirmado que la actividad FlbB se requiere en procesos que van más allá de la inducción de la expresión *brIA*. Por un lado, la caracterización del *cluster* metabólico *dba* ha relacionado la inhibición del desarrollo asexual con la síntesis de moléculas con actividad biológica. Por otro lado, se ha demostrado que FlbB y la ruta UDA pueden tener un papel clave en la sincronización de dos programas de desarrollo mutuamente excluyentes como son los ciclos de reproducción asexual y sexual.

La caracterización de los *cluster* metabólicos, en un principio, se centró en el análisis de la relación de éstos con la conidiación. También en el caso del *cluster An2030-2038*, porque previamente había sido descrito que una cepa que sobreexpresaba *pbcr*, el cual codifica un FT, mostraba una inhibición de la expresión del *cluster An2030-2038* y una reducción en el número de conidios respecto a la cepa silvestre (Bromann *et al.*, 2012). No obstante, en los estudios realizados y bajo las condiciones de estrés analizadas no se encontró ninguna relación evidente

de este *cluster* con el desarrollo asexual. Por otro lado, hay que tener en cuenta que su actividad está relacionada con la síntesis de derivados del benzaldehído (Ahuja *et al.*, 2012), que son compuestos antimicrobianos de amplio espectro que se emplean como bactericidas, fungicidas y algicidas (Subramanyam *et al.*, 2009). Por eso, se podría plantear como hipótesis que la función de las proteínas codificadas por los genes de este *cluster* puede estar relacionada con una hipotética actividad antimicrobiana, como posteriormente se planteó con el *cluster dba*.

La activación de los genes *dba* se describió por primera vez a partir de muestras de *A. nidulans* cultivadas junto con la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Schroeckh *et al.*, 2009). Posteriormente, (Gerke *et al.*, 2012) describieron su inducción en el mutante nulo del gen que codifica la subunidad CsnE del signalosoma, un complejo multimérico implicado en la degradación de proteínas (Nahlik *et al.*, 2010). En ambos estudios, los autores describieron una inducción simultánea de los genes del *cluster* de *dba* y los genes del *cluster* adyacente, el del ácido orselínico. En consecuencia, en un principio, se propuso que la regulación de ambas agrupaciones podría estar vinculada y que podrían cooperar en la producción de MMSS (Gerke *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2011). Sin embargo, los datos de RNA-seq analizados en esta tesis doctoral muestran que la ausencia de *flbB* induce la expresión del *cluster dba* pero no la del *cluster* del ácido orselínico, sugiriendo una regulación independiente para ambos. Aunque el significado biológico de esta observación sigue siendo desconocido, estudios recientes sobre el papel de los *cluster* de MMSS sugieren que una misma PKS puede participar en la síntesis de diferentes metabolitos (Zaehle *et al.*, 2014). Esta idea ha sido conceptualizada bajo el término “promiscuidad de las PKSs” y contribuiría al aumento de la diversidad de MMSS (Fischer, 2014). En este sentido, una hipotética colaboración entre las actividades de diferentes *cluster* metabólicos también contribuiría a aumentar todavía más el número de metabolitos activos producidos por cada especie fúngica.

Los estudios bioinformáticos sugieren además que los dos *cluster* metabólicos tienen un origen diferente, ya que, el *cluster dba*, pero no el del ácido orselínico, está completamente conservado en *T. stipitatus*. La presencia de este *cluster* en el genoma de ambas especies parece ser consecuencia de un proceso de transferencia horizontal de genes (HGT; de las siglas en inglés; *horizontal gene transfer*), hipótesis que apoyan publicaciones recientes y la baja conservación del *cluster dba* en los genomas de especies del género *Aspergilli* (Nguyen *et al.*, 2015). Además, hay que recordar que el metabolito DHMBA, producido por el *cluster dba*, inhibe el crecimiento de la bacteria *M. luteus* (Gerke *et al.*, 2012). Por lo tanto, es razonable sugerir que, al menos en este caso, el proceso de HGT ha transmitido ventajas selectivas (Keeling y Palmer, 2008; Marsit *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en MMA con cicloheximida, donde la ausencia de los genes *dba* en un fondo $\Delta flbB$ permitió un mayor crecimiento del hongo, se interpretaron en el contexto de una alteración de la cantidad/actividad de las proteínas, ya que la cicloheximida es un inhibidor de la traducción (Oshero y May, 2000). El efecto de su adición sobre la expresión del *cluster dba* podría ser equivalente al generado por la delección de *csnE*, ya que, esta inhibe la actividad del signalosoma COP9 y la degradación de proteínas. Así, aunque en sentido opuesto, ambos casos incidirían sobre la cantidad y actividad de las proteínas sintetizadas, lo que podría inducir la expresión de los genes del *cluster*. En este caso, la ausencia de actividad FlbB junto a la adición de cicloheximida al MMA podrían intensificar el efecto de activación y provocar la síntesis de metabolitos cuya actividad antimicrobiana también originaría cierta inhibición de su propio crecimiento. La molécula DHMBA caracterizada por (Gerke *et al.*, 2012) no tiene actividad anti-fúngica conocida, pero otras moléculas derivadas del benzaldehído y relacionadas con la expresión del *cluster dba* en determinadas condiciones de crecimiento podrían tenerla.

Por otro lado, se observó que FlbB y la ruta UDA son importantes en la coordinación de los programas de desarrollo asexual y sexual. Esta función se ejerce a través de UrdA, ya que,

La ausencia de este hipotético regulador transcripcional induce prematuramente el ciclo sexual e inhibe la producción de conidios. Es decir, se propone que UrdA conecta la ruta UDA con el control del desarrollo sexual, aunque nuestros resultados sugieren que esto no se produce a través del control de la expresión de *nsdD*.

Jin y colaboradores propusieron que el ortólogo de UrdA en *A. oryzae*, EcdR, es reprimido por su interacción con la proteína SclR (Jin *et al.*, 2011a), un FT HLH que promueve la formación de esclerocios, masas compactas de micelio desarrolladas para resistir en condiciones desfavorables y que, según se ha sugerido, podrían representar un vestigio de la producción cleistotecios (Geiser *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2011b). Sin embargo, la expresión del supuesto ortólogo de *sclR* en *A. nidulans*, *An7170*, no varía significativamente en ausencia de *flbB*. Esto sugiere que la ruta UDA inhibe el desarrollo sexual a través de la activación de *urdA* pero no la represión de la expresión de *An7170*. En cualquier caso, aunque la diana genética de la actividad UrdA sigue siendo desconocida, la existencia de proteínas que unen la vía UDA con la reproducción sexual encaja con la idea de que hay proteínas específicas y metabolitos endógenos dedicados a la coordinación de los programas morfogénicos, lo cual, permitiría moldear la colonia fúngica y optimizar la adaptación a las condiciones ambientales (Park y Yu, 2012; Rodríguez-Romero *et al.*, 2010; Ugalde y Rodríguez-Urra, 2014). Este tema será desarrollado en la Discusión general.

**Estudio de la función de FlbD en la
acumulación de FlbB en el núcleo.**

1.- Introducción.

FlbB presenta una localización subcelular muy característica, siendo detectado en la punta y los núcleos más apicales de la hifa (ver sección 4.3 en la Introducción). FlbB migra desde la punta de la hifa a los núcleos y, tras acumularse en ellos siguiendo un gradiente de concentración, realiza su actividad transcripcional junto a FlbD (Garzia *et al.*, 2010; Herrero-García *et al.*, 2015). Sin embargo, el mecanismo que controla dicho transporte basipetal es todavía desconocido. Con el objetivo de avanzar en su elucidación, se abrieron dos líneas de trabajo. Por un lado, se analizaron los dominios funcionales de FlbB con el fin de encontrar alguna señal interna que participara en su acumulación nuclear. Por otro lado, y teniendo en cuenta la relación funcional de los productos de *flbB* y *flbD*, la dependencia transcripcional del segundo respecto al primero, así como resultados preliminares que describían una deslocalización de FlbB en ausencia de actividad FlbD (Garzia *et al.*, 2010; Herrero-García, 2013), se decidió profundizar en el posible papel de FlbD en la acumulación nuclear de FlbB.

2.- Una señal de localización nuclear bipartita situada en el extremo N-terminal participa en la acumulación de FlbB en el núcleo.

El algoritmo NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) predijo la presencia de una NLS entre los residuos K57-R96 de FlbB. Debido a su similitud con una NLS bipartita consenso (KR/KK-X(10-12)-KRRK) (Fontes *et al.*, 2003), este dominio fue posteriormente acotado a la región entre los aminoácidos K57 y G70. La secuencia, (57)KK-X(8)-KRRG(70) (color verde en la Figura 5.1A y 5.1B), está ampliamente conservada entre los ortólogos de FlbB (Cortese *et al.*, 2011), sugiriendo que es importante para su actividad.

Un estudio previo que analizó la cepa BD14, la cual contiene el alelo mutante *flbB100* (G70R), permitió obtener información preliminar sobre este dominio (Etxebeste *et al.*, 2009a). A pesar de hallarse fuera del dominio bZIP de regulación transcripcional, la mutación generaba un fenotipo aconidial y provocaba una disminución clara de la capacidad del bZIP para unir a DNA. Con el objetivo de obtener más información sobre el papel que esta supuesta NLS pudiera ejercer en la actividad de FlbB y, más concretamente, en su importación nuclear, se mutaron a alanina dos de sus residuos altamente conservados: K67 y R68. La sustitución de los codones correspondientes para la generación de las cepas GFP::FlbB^(K67A;R68A), FlbB^(K67A;R68A)::GFP y *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB^(K67A;R68A) se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado 5.2 del capítulo 2 y fue confirmada mediante secuenciación. La presencia de las mutaciones K67A y R68A en la NLS se indicará mediante un asterisco (NLS*).

Las tres cepas mostraron un fenotipo aconidial similar al del mutante nulo de *flbB* (Figura 5.1C). Se concluyó, por tanto, que la sustitución de K67 y R68 por alaninas causa una pérdida de función de FlbB, independientemente del etiquetado en los extremos N- o C-terminal y el tipo de promotor utilizado.

Posteriormente, se estudió el efecto que estas mutaciones tenían en la localización subcelular de FlbB. En ambas cepas mutantes, GFP::FlbB^(NLS*) (Anexo 7) y FlbB^(NLS*)::GFP, FlbB se situaba en la punta de la hifa (Figura 5.1D). Sin embargo, se observó una fuerte disminución de la intensidad fluorescente en el núcleo apical, marcado en este caso mediante una fusión de la histona H1 con la proteína fluorescente mCh (HhoA::mCh) (Figura 5.1D). La relación entre la intensidad de la fluorescencia en la punta y el núcleo más apical (N1) aumentó de 1.50 ± 0.40 en la cepa silvestre a 2.60 ± 0.90 en el mutante NLS* (n = 20 hifas; p < 0.05; cambio significativo).

La expresión de *flbB* bajo el promotor *gpdA^{mini}* modificó su disposición dentro de la hifa (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014). La acumulación nuclear de FlbB no mantuvo su característico gradiente de concentración y FlbB se localizó en todos los núcleos, también en el

caso de la cepa *gpdA^{mini}::GFP::FlbB^(NLS*)*. Sin embargo, su fluorescencia en el núcleo apical disminuyó significativamente en comparación con la forma silvestre *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* (en este caso, el marcaje de los núcleos se realizó a través de la quimera HhoA::mRFP) (Figura 5.1E). La relación entre fluorescencias de la punta y el núcleo apical aumentó de 1.03 ± 0.22 a 1.31 ± 0.48 ($n = 20$; $p < 0.05$). También se midió un aumento significativo en los niveles citoplásmicos de FlbB. La relación de la fluorescencia de la punta frente al citoplasma disminuyó de 4.31 ± 0.89 en la cepa silvestre a 3.00 ± 1.05 en el mutante NLS* ($n = 20$; $p < 0.05$), mientras que la relación entre las fluorescencias del núcleo apical y el citoplasma se redujo de 4.28 ± 0.97 a 2.35 ± 0.54 ($n = 20$; $p < 0.05$).

Estas variaciones causadas por las mutaciones K67A y R68A permiten sugerir que la acumulación de FlbB en el citoplasma podría ser debida a una inhibición en el transporte a los núcleos. Por tanto, el conjunto de resultados obtenidos sugiere que una NLS, donde los residuos K67 y R68 jugarían un papel importante, dirige a FlbB a los núcleos.

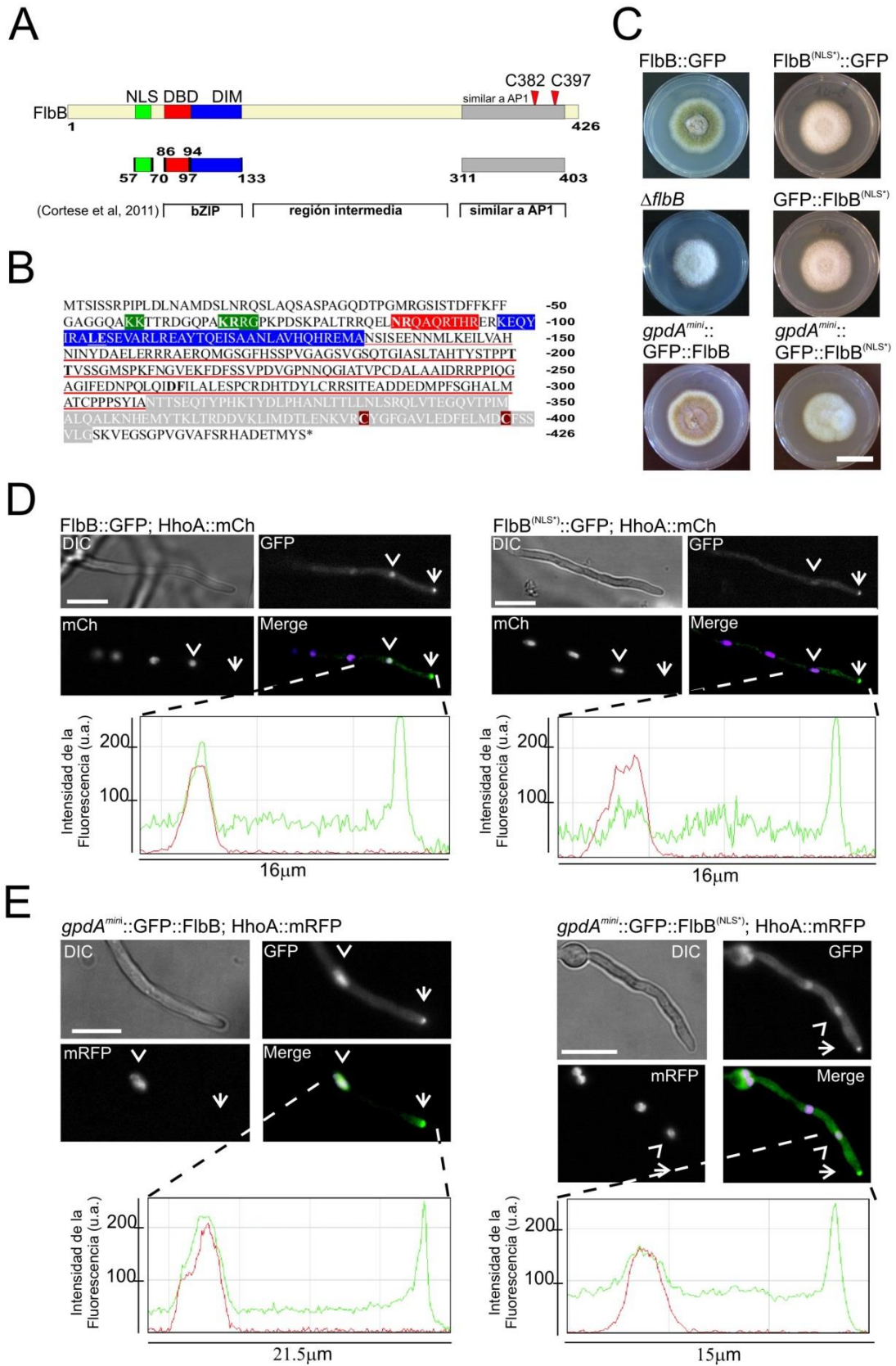


Figura 5.1. Análisis del dominio NLS de FlbB. A y B) Posición de los dominios funcionales de FlbB analizados por (Herrero-García *et al.*, 2015). Se indican las tres regiones principales: el dominio bZIP, la región intermedia (subrayada en rojo en el panel B) y la región C-terminal, similar a la región equivalente de la familia de FTT del tipo bZIP AP-1 (gris) (Glover y Harrison, 1995), la cual modula la respuesta al estrés oxidativo (Asano *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2002). El color verde indica el dominio NLS, el color rojo el dominio de unión a DNA (DBD, de las siglas del inglés: *DNA binding domain*) y el color azul el dominio de dimerización (DIM). Los residuos del dominio NLS mutados a alanina están en negrita y subrayados. C) Fenotipo de las cepas FlbB^(NLS*)::GFP, GFP::FlbB^(NLS*) y *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB^(NLS*) después de 72 h de cultivo en placas MMA. Las cepas FlbB::GFP, Δ *flbB* y *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB se utilizaron como controles. Barra de escala = 2 cm. D y E) Localización subcelular de la quimera FlbB^(NLS*)::GFP, expresada tanto bajo promotor *flbB^p* como *gpdA^{mini}*, en cepas que también expresan las quimeras HhoA::mCh o HhoA::mRFP, respectivamente, como marcadores de los núcleos. Barra de escala = 5 μ m. También se muestran los diagramas de intensidad fluorescente verde y roja a lo largo de las regiones indicadas (unidades arbitrarias).

3.- La delección de *flbD* modifica la localización subcelular de FlbB y permite el estudio de su movilidad en el citoplasma.

Resultados preliminares mostraron que la localización subcelular de FlbB::GFP, expresada bajo promotor nativo, podría sufrir importantes alteraciones en un fondo genético Δ *flbD* (Herrero-García, 2013). La acumulación nuclear de FlbB parecía verse claramente reducida frente a la observada en un fondo genético silvestre (Figura 5.2A). Este extremo fue confirmado utilizando la quimera HhoA::mCh como marcador de núcleos (Figura 5.2A). La relación entre intensidad de la fluorescencia en la punta respecto a la del núcleo apical aumentó de 1.50 ± 0.40 en el fondo silvestre a 13.90 ± 3.00 en el mutante nulo de *flbD* ($n = 10$ hifas; $p < 0.05$, cambio significativo; Figura 5.2A).

La delección de *flbD* permitió además seguir el movimiento citoplásmico de FlbB::GFP (Figura 5.2B y C), algo que no es posible estudiar en un fondo genético silvestre. Para ello se registraron en el microscopio secuencias de imágenes mediante el modo *Stream acquisition* (80 imágenes secuenciales con una exposición de 500 ms cada una). Estos registros permitieron obtener quimogramas, los cuales representan la intensidad de la fluorescencia en cada una de las imágenes a lo largo de una línea trazada, permitiendo seguir el movimiento de

los *patches* citoplásmicos de FlbB. El eje Y en los quimogramas representa la escala de tiempo, mientras que el eje X indica la longitud del segmento analizado (o posición del *patch* en la hifa). Así, las estructuras estáticas o vagamente móviles aparecen como líneas verticales, mientras que los puntos móviles se observan como líneas diagonales.

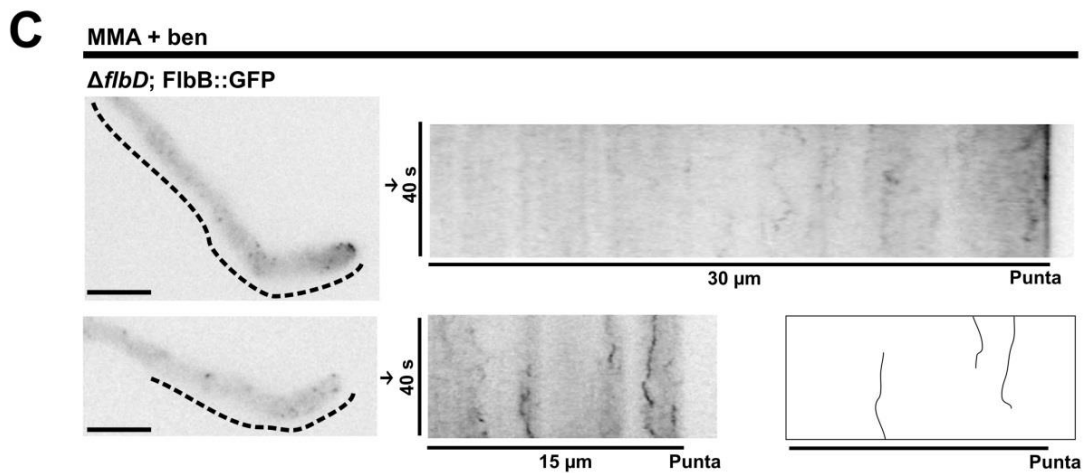
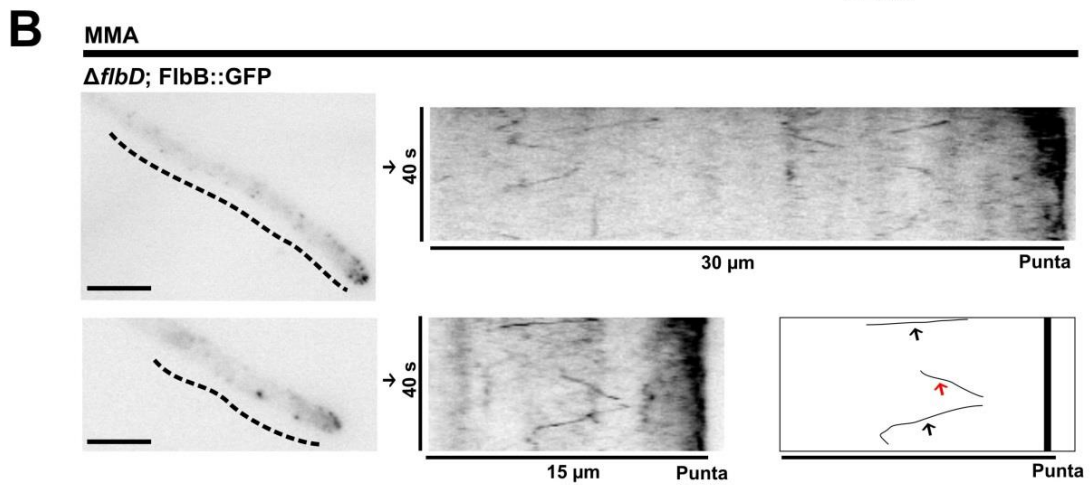
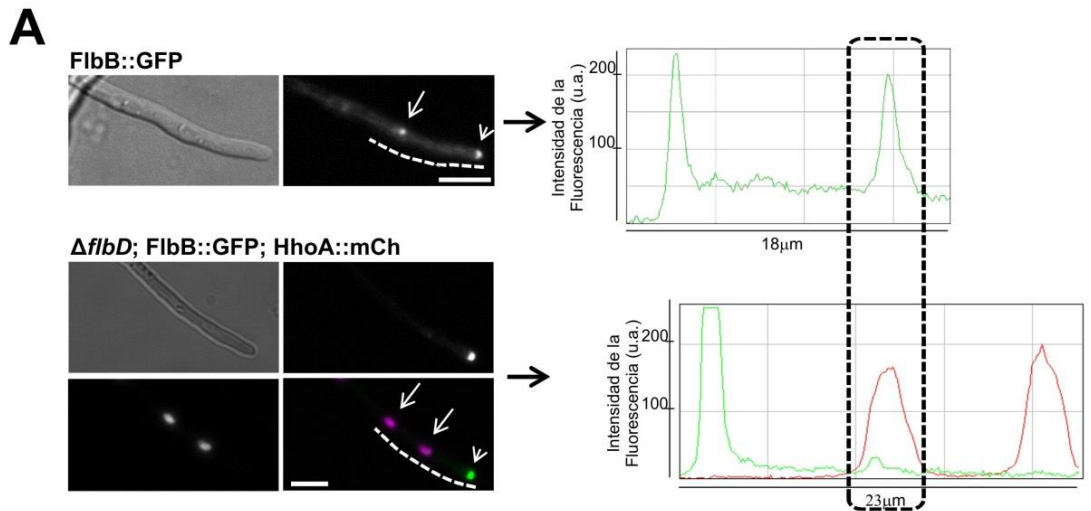


Figura 5.2. Localización subcelular y movimiento citoplásmico de FlbB::GFP en fondo nulo de *flbD*. A) Localización de FlbB::GFP en un fondo genético $\Delta flbD$. La delección de *flbD* provoca una reducción significativa en la acumulación nuclear de FlbB. Las gráficas de la derecha representan la intensidad de la fluorescencia verde y/o roja a lo largo de las líneas trazadas (unidades arbitrarias). Barra de escala = 5 μm . B) Movimiento citoplásmico de FlbB::GFP en un fondo genético $\Delta flbD$. Se muestran dos hifas a modo de ejemplo, con sus respectivos quimogramas a la derecha. El diagrama indica las trayectorias de transporte basipetal (flechas negras) y acropetal (flecha roja). Barra de escala = 5 μm . C) Estudio de la trayectoria de FlbB::GFP en un fondo genético $\Delta flbD$ en medio que contiene benomilo como agente inhibidor del transporte MT-dependiente. La verticalidad de las trayectorias sugiere una inhibición del movimiento citoplásmico de FlbB. Barra de escala = 5 μm .

Los quimogramas obtenidos en MMA para la cepa $\Delta flbD$; FlbB::GFP mostraron, por un lado, una línea estática que corresponde a la fluorescencia de la punta de la hifa, la cual disminuye a medida que avanza el quimograma, probablemente debido a la larga exposición a la luz incidente (Figura 5.2B). Por otro lado, mostraron líneas diagonales que se alejaban o acercaban a ella, indicando un transporte basipetal (flecha negra) o acropetal (flecha roja), respectivamente. El trazado y tipo de movimiento en ambas direcciones parecía reflejar un movimiento MT-dependiente (Abenza *et al.*, 2009; Pantazopoulou *et al.*, 2014), por lo que se decidió estudiar el movimiento de FlbB::GFP en el mismo fondo genético pero, en un medio de cultivo que contuviera 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomilo, un compuesto que desorganiza los dímeros α/β de tubulina (Penalva, 2005). Los resultados de la Figura 5.2C muestran claramente la inhibición del movimiento citoplásmico de FlbB (trayectorias verticales en los quimogramas). Debe señalarse que tras la eliminación de la droga del medio de cultivo, no se volvió a recuperar el movimiento citoplasmático de FlbB (no mostrado).

Los resultados expuestos en esta sección sugieren que en ausencia de actividad FlbD, FlbB no se acumula en el núcleo y permanece en el citoplasma moviéndose en ambas direcciones a través de un mecanismo que parece ser dependiente de MMTT. Así, el fondo genético nulo en *flbD* podría constituir una herramienta válida para tratar de identificar proteínas que participen en el transporte basipetal de FlbB (ver siguiente capítulo).

4.- El aumento de la expresión de *flbD* induce el desarrollo asexual y modifica la localización nuclear de FlbB.

Tras corroborar que la delección de *flbD* provocaba una reducción significativa en la acumulación nuclear de FlbB, se quiso analizar si su sobre-expresión causaba el efecto contrario, y si la predictivamente mayor acumulación nuclear de FlbB en estas condiciones podría estar relacionada con la inducción prematura de la conidiación descrita por Wieser y colaboradores para la sobreexpresión de *flbD* (Wieser y Adams, 1995). Con ése objetivo se generó una cepa *alcA(p)::flbD* (Garzia *et al.*, 2010) que expresara la quimera FlbB::GFP.

4.1. La sobreexpresión de *flbD* induce la conidiación.

Para confirmar la inducción prematura de la conidiación debido a la sobre-expresión de *flbD* (Wieser y Adams, 1995), primero, se reprodujo el experimento en medio líquido realizado por los citados autores (Figura 5.3A). El estudio se realizó tal y como se describe en el apartado 2 del capítulo 2 de esta tesis doctoral. Tras la incubación de las cepas FlbB::GFP, *alcA(p)::flbD* y *alcA(p)::flbD; FlbB::GFP* en MMA, todas mantenían un crecimiento vegetativo (Figura 5.3A). Sin embargo, tras la transferencia de las muestras al medio inductor (treonina 100mM) y 22 horas de cultivo se observó que, al igual que en (Wieser y Adams, 1995), la sobreexpresión de *flbD* en hifas sumergidas dio lugar a la producción de conidióforos (Figura 5.3A). La cepa control FlbB::GFP generó un número escaso de conidióforos tras la incubación en el medio inductor, pero dichos conidióforos no contenían todos los tipos celulares y, además, generaban entre una y tres fiálidas con un número limitado de conidios cada una de ellas. Esta morfología es la típica de las estructuras generadas en condiciones de agotamiento de la fuente de carbono (Skromne *et al.*, 1995).

4.2. Análisis en medio sólido.

Después de confirmar que la sobreexpresión de *flbD* induce la conidiación en medio líquido, se analizó el efecto en placa (Figura 5.3B). En este caso, no obstante, también se

analizaron las posibles diferencias fenotípicas que podían derivarse del uso de etanol o treonina como fuentes de carbono inductoras.

La producción de conidios en la cepa FlbB::GFP tras 72 h de cultivo fue similar en MCA con etanol 1% (v/v) ($2.6 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^6$ conidios/cm²) y MCA con glucosa 2% (p/v) ($2.7 \times 10^7 \pm 7.9 \times 10^6$ conidios/cm²), aunque fenotípicamente se puedan observar más hifas aéreas en medio con etanol 1% (v/v) (Figura 5.3B; filas 1 y 2). Sin embargo, las cepas *alcA(p)::flbD* y *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP mostraron un comportamiento desigual en estos dos medios. En MCA con glucosa 2% (p/v), la producción de conidios fue significativamente mayor que en la cepa silvestre ($5.4 \times 10^7 \pm 6.4 \times 10^6$ conidios/cm² para la cepa *alcA(p)::flbD*; y $5.9 \times 10^7 \pm 7.7 \times 10^6$ conidios/cm² para la cepa *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP; n = 3 para cada cepa y p < 0.05 en ambos casos). En MCA con etanol 1% (v/v), no obstante, no hubo un aumento significativo de su concentración (*alcA(p)::flbD*: $3.1 \times 10^7 \pm 5.1 \times 10^6$ conidios/cm²; *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP: $2.3 \times 10^7 \pm 5.5 \times 10^6$ conidios/cm²; n = 3 para cada cepa y p > 0.05 en ambos casos). Finalmente, la concentración de conidios fue cuantitativamente menor en medio con treonina (100mM) en comparación con los medios de cultivo anteriores, tanto en el caso de la cepa silvestre FlbB::GFP como en el caso de las cepas bajo el promotor *alcA*. Sin embargo, hubo un aumento significativo en la producción en las cepas *alcA(p)::flbD* ($1.0 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$ conidios/cm²) y *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP ($1.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$ conidios/cm²) respecto al control FlbB::GFP ($5.5 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$ conidios/cm²; n = 3 para cada cepa; p < 0.05 en ambos casos).

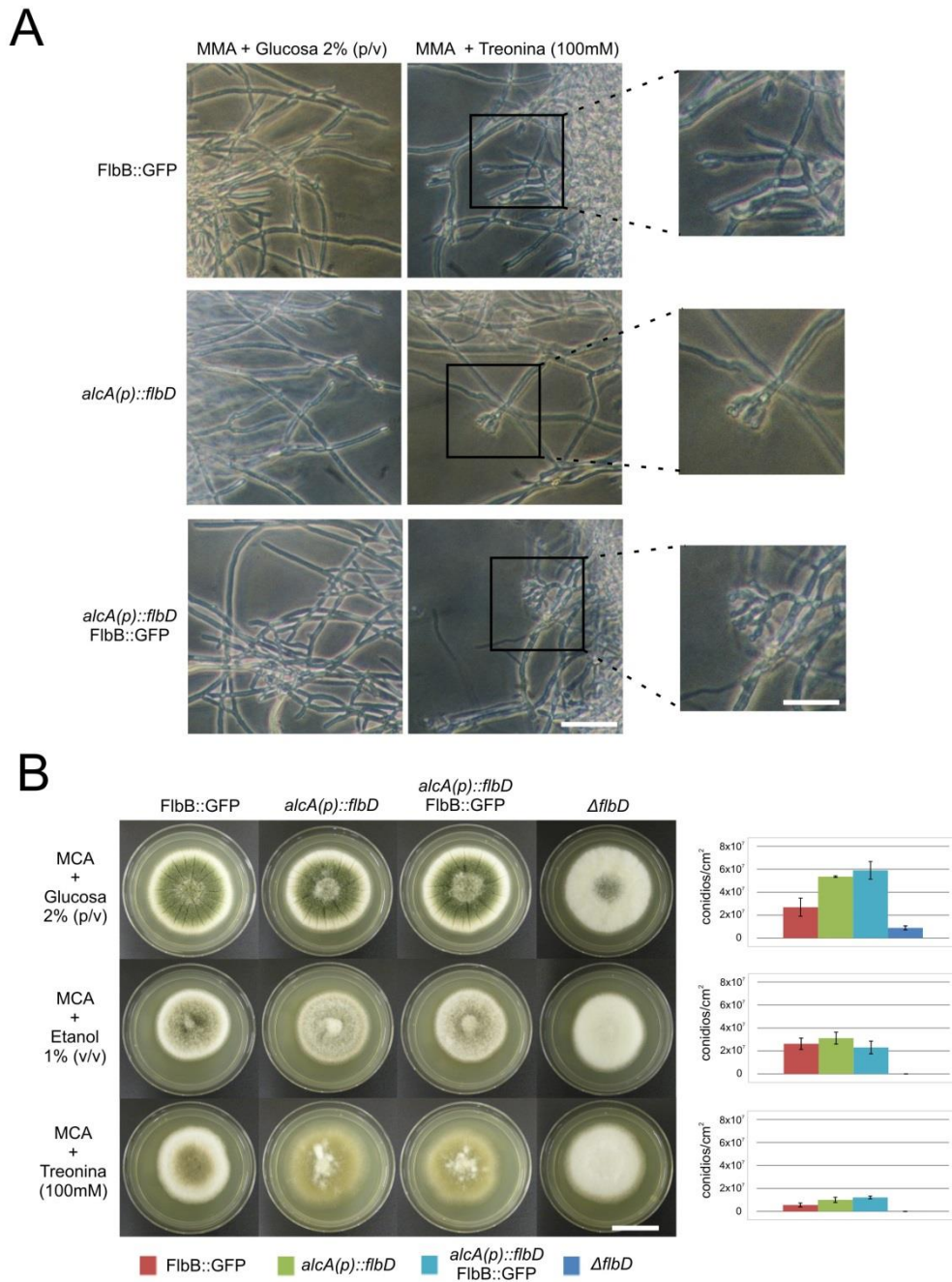


Figura 5.3. Efecto de la sobreexpresión de *flbD* sobre la conidiación. A) Generación de conidióforos en hifas sumergidas al sobreexpresar *flbD*. La columna de la izquierda muestra el fenotipo de las cepas FlbB::GFP, *alcA(p)::flbD* y *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP tras 18 horas de incubación en MMA (glucosa al 2% p/v como fuente de carbono). La columna derecha muestra las imágenes de las mismas cepas tras incubarlas durante 22 h adicionales en MMA con treonina (100mM) como fuente de carbono. Barra de escala, 30 μ m, y 15 μ m en las imágenes ampliadas. B) Efecto de la sobreexpresión de *flbD* sobre la conidiación en medio sólido. Las cepas arriba indicadas fueron cultivadas junto con el mutante $\Delta flbD$ en condiciones no inductoras (MCA con glucosa al 2% p/v) y supuestamente inductoras (MCA con etanol al 1%, v/v o 100mM de treonina). Las fotografías muestran los fenotipos tras 72 h de incubación a 37 °C y los diagramas a la derecha muestran las respectivas concentraciones de conidios. Barra de escala = 2 cm.

Estos resultados indicaron que, en medio sólido, la inducción de *alcA(p)::flbD* con treonina (100mM) daba lugar a una mayor producción de conidios respecto a la cepa control, por lo que esta fuente de carbono parecía apropiada para los análisis que se mostrarán en la siguiente sección. El uso del etanol 1% (v/v) como fuente de carbono inductora en este sistema fue cuestionable, ya que la diferencia en la concentración de conidios no era significativa respecto a la de la cepa silvestre y, además, se observaba un mayor número de hifas aéreas no conidiantes respecto al medio con glucosa 2% (p/v).

4.3. Efecto de la sobreexpresión de *flbD* sobre la localización nuclear de FlbB.

La localización de FlbB en la cepa *alcA(p)::flbD; FlbB::GFP* fue estudiada en cultivo líquido estático con cada una de las tres fuentes de carbono analizadas en la sección anterior. La cepa *FlbB::GFP* fue utilizada como control. En medio con glucosa 0.1% (p/v), la cepa *alcA(p)::flbD; FlbB::GFP* presentó una localización de FlbB similar a la observada en la cepa $\Delta flbD; FlbB::GFP$ (Figuras 5.2A y 5.4A). Es decir, FlbB se detectaba en la punta de la hifa pero había una disminución significativa en su fluorescencia nuclear (Figura 5.4A), mostrando una relación de intensidad fluorescente punta/N1 (se consideró la fluorescencia citoplasmática como fluorescencia del núcleo apical o N1) significativamente mayor (3.64 ± 1.09) que la de la cepa silvestre (1.29 ± 0.19 ; $n = 15$ en ambas cepas; $p < 0.05$; cambio significativo). Se obtuvieron resultados similares en medio que contenía etanol (al 1%, v/v) y glucosa (al 0.05%, p/v) como fuentes de carbono (Figura 5.4B). En este caso, la relación de la intensidad fluorescente punta/N1 (medida nuclear calculada en base a la intensidad citoplasmática) disminuyó de 4.46 ± 1.27 a 1.26 ± 0.21 de la cepa silvestre ($n = 15$ en ambas cepas; $p < 0.05$; cambio significativo).

Los resultados obtenidos en medio con treonina (100mM) fueron opuestos a los descritos en el párrafo anterior. En este caso, fue en la cepa FlbB::GFP donde no había acumulación nuclear mientras que en la cepa *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP, se recuperó la localización nuclear de FlbB (Figura 5.4C). Así, se calculó un aumento en la relación de la intensidad fluorescente entre punta y núcleo apical de 1.07 ± 0.15 de la cepa *alcA(p)::flbD*; FlbB::GFP a 2.48 ± 0.55 de la cepa silvestre ($n = 15$ en ambas cepas; $p < 0.05$; cambio significativo). En la cepa silvestre se consideró la fluorescencia citoplasmática como fluorescencia del núcleo apical.

Considerando los resultados mostrados en la figura 5.4 puede sugerirse que la sobreexpresión de *flbD* en medio con treonina (100mM) causa un aumento de la localización nuclear de FlbB. Sin embargo, no puede relacionarse directamente, por el momento, la mayor acumulación nuclear de FlbB causada por la sobreexpresión de *flbD* con la producción de conidióforos descrita en la Figura 5.3A, ya que, en este último experimento no se observó formación alguna de conidióforos, probablemente como consecuencia de haberse realizado en cultivo estático.

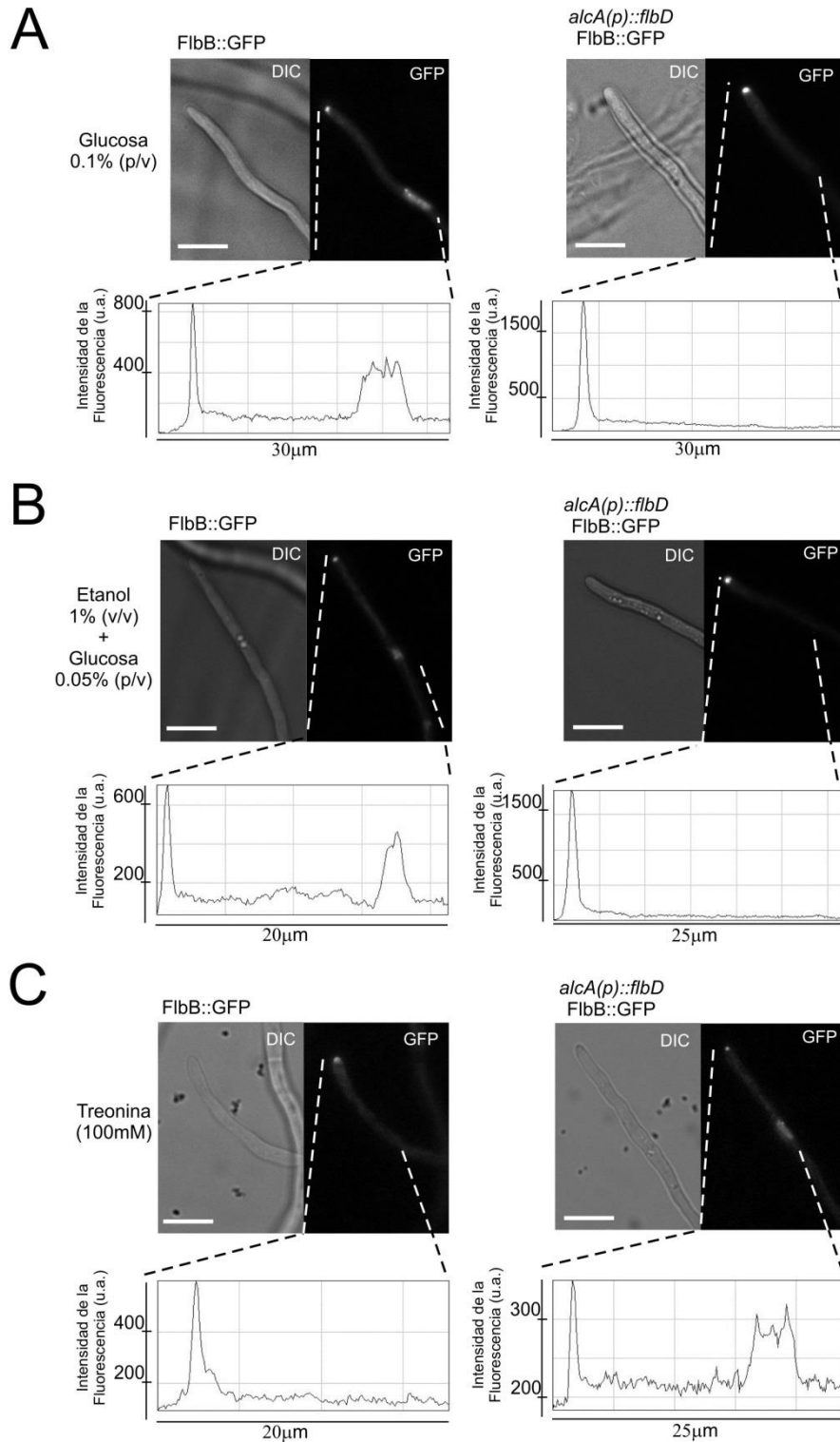


Figura 5.4. Localización subcelular de FlbB::GFP en cepas de fondo genético silvestre o *alcA(p)::flbD*. A) Localización en medio con glucosa 0.1% (p/v). Las gráficas inferiores muestran el valor de la intensidad fluorescente a lo largo de la región analizada. La fluorescencia citoplasmática fue utilizada como medida de la fluorescencia del núcleo apical en el caso de no detectar a FlbB en este. B) y C) Localización en medio con etanol (al 1% v/v) y glucosa (al 0.05%, p/v), o treonina (100mM), respectivamente. Barra de escala en todos los paneles = 5 µm.

5.- Análisis preliminar de los dominios de FlbB necesarios en su posible interacción con FlbD.

Debido a la relación funcional que existe entre ambos FFTT respecto a la inducción de la conidiación y la existencia de mecanismos de regulación transcripcional del desarrollo eucariota basados en la interacción entre FFTT de las familias bZIP y c-Myb (Tahirov *et al.*, 2002), se estudió la posible interacción entre FlbB y FlbD. Una primera aproximación la realizó el Dr. Etxebeste mediante la técnica BiFC (de sus siglas en inglés: *bimolecular fluorescence complementation*) (Hu *et al.*, 2002; Takeshita *et al.*, 2008). Para ello, se generó una cepa que expresara, por un lado, una quimera en la que la mitad N-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP_N) había sido fusionada al extremo C-terminal de FlbB (FlbB::YFP_N) y, por el otro lado, una segunda quimera en la que la mitad C-terminal de YFP (YFP_C) había sido fusionada al extremo C-terminal de FlbD (FlbD::YFP_C). Sin embargo, no se observó fluorescencia amarilla, la cual hubiera correspondido a la proteína fluorescente reconstituida. Una segunda aproximación se basó en la técnica del *pull-down*, utilizando para ello una quimera GST::FlbB expresada en *E. coli* y extractos proteicos de una cepa de *A. nidulans* que expresaba la quimera FlbD::HA_{3x} (Herrero-García, 2013). En este caso, sí se detectó una banda de retención de FlbD::HA_{3x}. Debido a la disponibilidad de alelos de FlbB que portan mutaciones en cada uno de sus dominios funcionales caracterizados, en esta tesis doctoral se ha analizado qué dominios mediarían dicha retención.

Utilizando como control la banda de FlbD::HA_{3x} retenida por GST::FlbB, se emplearon las formas mutantes de los dominios DIM* (L104A; E105A), DBD* (N86A; R87A) y NLS* (K67A; R68A) (Figura 5.1A y 5.1B) para analizar la importancia de los dominios en el extremo N-terminal de FlbB (Figura 5.5A). La cuantificación de la relación entre la intensidad de la banda de *Western-blot* y la de tinción con Coomassie indicó que no había una disminución significativa en la capacidad de las formas mutantes para retener a FlbD::HA_{3x} (WT: 0.73 ± 0.24 ; DIM*: 0.66 ± 0.40 ; DBD*: 0.40 ± 0.24 ; NLS*: 0.54 ± 0.24 ; n = 3 y p > 0.05 en todos los casos). Es

decir, las mutaciones analizadas en el extremo N-terminal de FlbB no parecen alterar de forma significativa la capacidad para retener a FlbD::HA_{3x} respecto a la forma silvestre.

Se analizó también si el dominio bZIP de FlbB (residuos 67-140), situado en el extremo N-terminal, era capaz de retener por sí sólo a FlbD::HA_{3x} (Figura 5.5B). Aunque se pudo detectar la banda de retención, la relación entre intensidades de bandas (Western-blot/coomassie) disminuyó significativamente con respecto a la forma silvestre, de 0.80 ± 0.25 a 0.39 ± 0.23 ($n = 5$; $p < 0.05$). Debido a un papel menor del dominio NLS de FlbB en la retención de FlbD::HA_{3x} (ver párrafo anterior), se concluyó que el extremo C-terminal de FlbB tiene un papel modulador, aunque no esencial, en dicha retención.

Finalmente, para definir más en profundidad el papel del dominio C-terminal de FlbB, y considerando la importancia de la cisteína en la posición 382 en la actividad de FlbB y su interacción con FlbE, se analizó el efecto causado por la mutación C382A (Herrero-García *et al.*, 2015). A pesar de que se detectó la banda de retención de FlbD::HA_{3x}, debe tenerse en cuenta que la afinidad de la fusión GST::FlbB(C382A) por la resina de glutatión sefarosa es claramente menor que la de la forma GST::FlbB silvestre (Herrero-García *et al.*, 2015). Por ello, se cuantificó la relación de intensidades de bandas de *Western-blot* y tinción con Coomassie, observándose un aumento significativo, de 0.60 ± 0.11 en el caso de la quimera silvestre a 1.22 ± 0.29 en el caso de la forma mutante C382A ($n = 4$ para cada fusión; $p < 0.05$). Los resultados, por tanto, llevaron a sugerir que la mutación C382A podría aumentar la capacidad de retención de FlbD::HA_{3x}. En la Discusión se especula sobre el significado biológico que esto podría tener en el modelo de inducción de la esporulación.

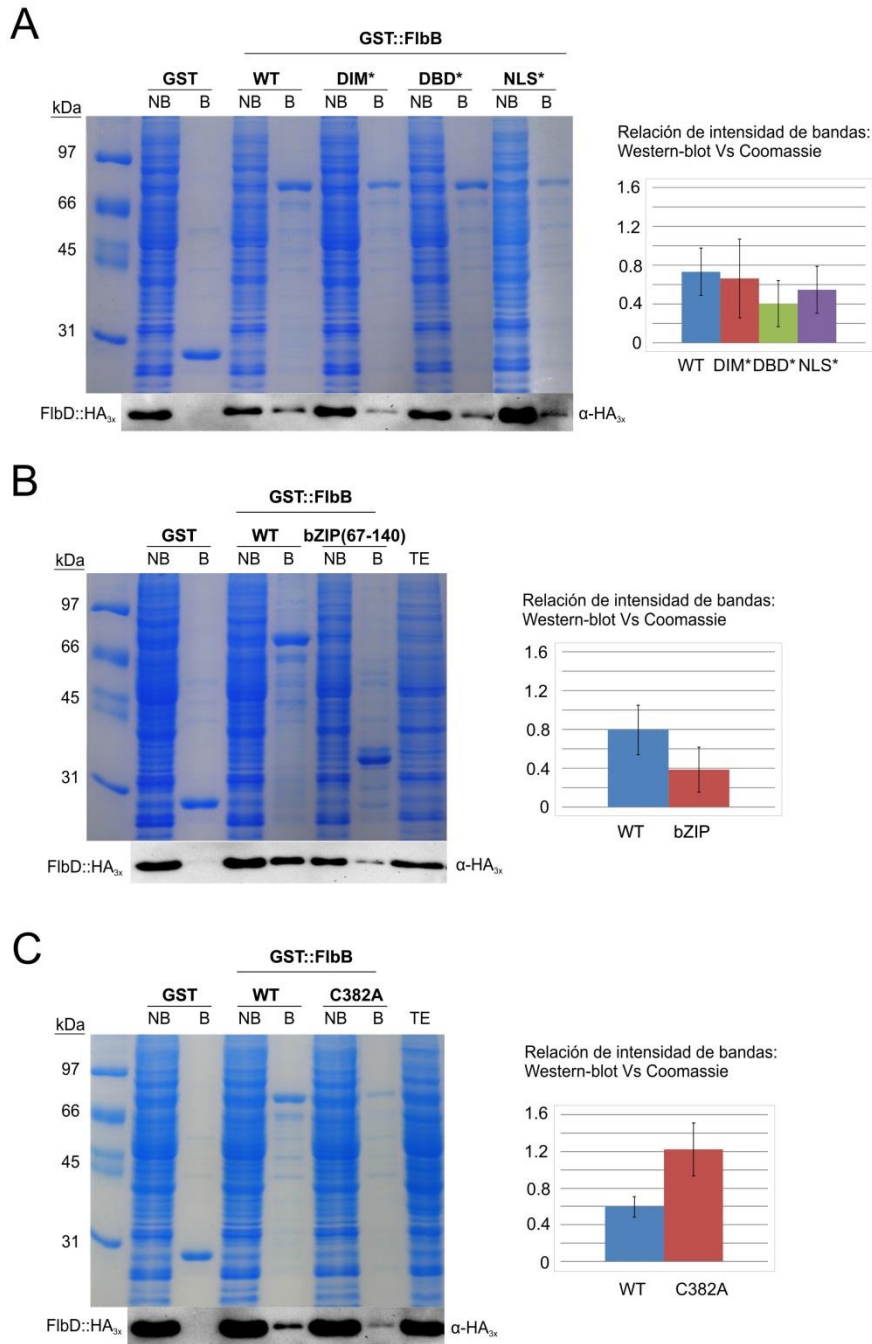


Figura 5.5. Modificaciones en la retención de FlbD::HA_{3x} causadas por mutaciones específicas en FlbB. A) Ensayo *pull-down* de GST y las quimeras GST::FlbB, GST::FlbB(DIM*), GST::FlbB(DBD*) y GST::FlbB(NLS*) frente a extractos proteicos de una cepa que expresa la quimera FlbD::HA_{3x}. El gráfico a la derecha representa la relación entre la intensidad de la banda de *Western-blot* y la de tinción con Coomassie para cada una de las construcciones ensayadas. Los valores son la media de tres medidas más *sem*. B) Ensayo *pull-down* de GST y las quimeras GST::FlbB y GST::FlbB(67-140) frente a extractos proteicos de una cepa que expresa la quimera FlbD::HA_{3x}. Los valores en el gráfico de la derecha corresponden a cinco medidas para cada construcción. C) Ensayo *pull-down* de GST y las quimeras GST::FlbB y GST::FlbB(C382A) frente a extractos proteicos de una cepa que expresa la quimera FlbD::HA_{3x}. Los valores en el gráfico de la derecha corresponden a cuatro medidas para cada construcción.

6.- Discusión.

Los resultados de este capítulo han confirmado que para su acumulación en el núcleo FlbB requiere, por una parte, una señal de localización nuclear o NLS situada en el extremo N-terminal (Herrero-García *et al.*, 2015) y, por otra parte, la actividad de FlbD, cuya ausencia inhibe la acumulación nuclear del bZIP.

La existencia de un dominio de FlbB que pudiera actuar como NLS abre una nueva vía de estudio respecto a su mecanismo de transporte. Las secuencias NLS son reconocidas por proteínas especializadas llamadas carioferinas, las cuales, median el transporte de los FTT al núcleo a través del complejo del poro nuclear (Freitas y Cunha, 2009; Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2011). Por lo tanto, la identificación de la carioferina encargada de la importación nuclear de FlbB contribuiría a la comprensión del mecanismo de transporte basipetal. En eucariotas, el heterodímero importina- α/β constituye una vía de translocación nuclear bien caracterizada (Fried y Kutay, 2003). La función de la importina- α en ella es la de adaptador, una proteína que contiene la κ NLS (del inglés: *classical NLS*) a la importina- β 1, que es quien facilita su translocación al núcleo (Goldfarb *et al.*, 2004). Esta vía, que requiere de la participación de proteínas auxiliares, facilita la importación efectiva de los cargos a través de un mecanismo de translocación basado en un gradiente RanGDP/GTP entre el citoplasma y el núcleo (Gorlich y Kutay, 1999; Hood y Silver, 1998). Hay varias evidencias que hacen a la importina- α , KapA en *A. nidulans*, y, por extensión a la importina- β , KapB, candidatos para facilitar el transporte de FlbB al núcleo. Las NLS bipartitas consenso son reconocidas por la importina- α (Lange *et al.*, 2007) y la secuencia de la supuesta NLS de FlbB tiene una elevada similitud respecto a dicho consenso. Por ello, y aunque no se pueda descartar la unión con otras importinas, es posible que FlbB interactúe con KapA. Además, KapA y KapB son las únicas carioferinas de *A. nidulans* para las cuales ha sido descrito un movimiento citoplásmico bidireccional, MT-dependiente, hacia y desde la punta de las hifas vegetativas (Etxebeste *et al.*, 2013). Este movimiento recuerda al descrito en esta tesis doctoral para FlbB en un fondo genético $\Delta flbD$.

Con el objetivo de analizar si la carioferina KapA juega un papel importante en el transporte basipetal de FlbB y su importación al núcleo, se generó una cepa que expresara la quimera FlbB::GFP en un fondo genético *kapA31* (Araujo-Bazan *et al.*, 2009). El alelo *kapA31* porta la mutación S111F en la primera de las repeticiones Armadillo (Araujo-Bazan *et al.*, 2009), causando un fenotipo termosensible en el que la actividad KapA es inhibida a temperaturas restrictivas (42°C) pero es permitida a 25 o 30°C. En medio sólido las cepas portadores de la mutación *kapA31* mostraban ya un fenotipo *fluffy* a 37°C (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Sin embargo, los estudios de microscopía no permitieron concluir que la importina α era necesaria para el importe nuclear de FlbB. A 37°C no se observaban diferencias significativas en la localización de FlbB::GFP al comparar los fondos genéticos *kapA31* y *kapA* silvestres, y a la temperatura restrictiva de 42°C, FlbB perdía su localización nuclear también en la cepa control *kapA* silvestre, lo cual impidió realizar ningún análisis en profundidad (no mostrado).

Un abordaje experimental posible para analizar la relevancia del dominio NLS y su hipotética relación con las importinas KapA y KapB sería aprovechar el aumento de la movilidad citoplasmática de FlbB observado en un fondo genético $\Delta flbD$. El estudio de la trayectoria de FlbB^(NLS*)::GFP en un fondo genético $\Delta flbD$ permitiría determinar si el dominio NLS es necesario para el transporte basipetal de FlbB o solamente se requiere en el proceso de importación nuclear. En el mismo fondo genético también sería interesante analizar la posible colocalización de FlbB y KapA o KapB (Etxebeste *et al.*, 2013). Una segunda posibilidad sería analizar la posible interacción entre FlbB y KapA mediante experimentos de *pull-down*. Una aproximación similar fue utilizada por Araujo-Bazán y colaboradores para identificar a los interactores de KapA (Araujo-Bazan *et al.*, 2008a), sin que entre la lista de candidatos se hallara FlbB. En este caso, sería interesante comprobar si FlbB es capaz de retener a KapA en experimentos de *pull-down* y comparar dicha capacidad de retención con la del mutante NLS*.

Una posibilidad parcialmente explorada es que FlbB fuera importada al núcleo por otra carioferina. En este sentido, se ha descrito que la carioferina Kap1 también juega un papel importante en la diferenciación asexual (Etxebeste *et al.*, 2009b), ya que a pesar de que en la cepa $\Delta kap1$ se detecte expresión de *brlA*, la ausencia de este importador nuclear reduce significativamente la producción de conidióforos. Se descartó, no obstante, que Kap1 fuera el importador principal de FlbB (Etxebeste *et al.*, 2009b), porque la localización de FlbB::GFP en un fondo $\Delta kap1$ era similar a la de una cepa silvestre. No se descarta que FlbB pueda ser transportado al núcleo por más de una carioferina, ya que, ha sido planteado en otros organismos que el transporte de cargos mediante carioferinas puede ser redundante (Fiserova y Goldberg, 2010; Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2011).

De entre los elementos necesarios para la acumulación nuclear de FlbB, el segundo conocido es FlbD. Su ausencia inhibe significativamente la acumulación nuclear de FlbB mientras que su sobre-expresión parece causar un aumento en ella en comparación con la cepa control. Sin embargo, en este último caso, no se induce la formación de conidióforos en las condiciones de cultivo utilizadas en estos experimentos de microscopía. Por ello, no se puede afirmar que el aumento de la acumulación nuclear de FlbB que se describe al sobreexpresar *flbD* es el factor que desencadena la formación de conidios (Wieser y Adams, 1995). La sobreexpresión de *flbD* en un fondo genético $\Delta flbB$, no obstante, no es suficiente para inducir la conidiación (Garzia *et al.*, 2010), por lo que ambos factores están implicados en el proceso. Además, debe tenerse en cuenta también que la expresión constitutiva de *flbB* y la subsiguiente acumulación de este FT en todos los núcleos no es suficiente para la activación de la conidiación (Herrero-García *et al.*, 2015), lo cual, confiere un papel relevante a los niveles y actividad de FlbD en este proceso.

En cuanto a la posible interacción entre los dos FTT, los ensayos de *pull-down* muestran que la quimera GST::FlbB expresada en bacteria retiene a FlbD::HA_{3x}. Sin embargo, la

afinidad de FlbB por FlbD en las condiciones estudiadas es claramente menor que la que presenta por FlbE (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), lo cual podría corresponderse con un transporte inicial de FlbB a la punta mediado por FlbE, seguido de su acumulación FlbD-dependiente en el núcleo. La capacidad de FlbB para retener a FlbD::HA_{3x} parece aumentar significativamente al introducir la mutación C382A, al contrario de lo que ocurre con la interacción con FlbE, la cual disminuye en este fondo genético mutante (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Esta cisteína está completamente conservada entre los ortólogos de FlbB y desempeña un papel clave en su localización y función (Cortese *et al.*, 2011; Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Las modificaciones en las cisteínas afectan, entre otras, a la formación de puentes disulfuro y a la conformación (y por tanto, su actividad) de las proteínas, como ocurre en el caso de Pap1 (Castillo *et al.*, 2002). De la misma forma, la actividad de FlbB podría depender de la formación de puentes de disulfuro que proporcionaran una conformación determinada. Cambios en dicha conformación podrían regular las interacciones que establece este FT, determinando así su localización, dinámica y actividad transcripcional.

Para profundizar en el papel de ambos FT respecto a la activación de la conidiación, sería interesante generar cepas que expresasen formas mutantes de FlbD. Las mutaciones de estas cepas serían identificadas, su efecto sobre los niveles y localización de FlbD y FlbB analizada y la capacidad de interacción de las formas mutantes determinada en experimentos de *pull-down*. Aquellas mutaciones que disminuyeran la acumulación nuclear de FlbD deberían acompañarse de una disminución en la de FlbB, mientras que de aislar alguna mutación que aumentara la acumulación nuclear de FlbD, ello también debería aumentar los niveles nucleares de FlbB. El efecto de dichas mutaciones de FlbD sobre la afinidad entre ambos FTT y su localización, junto con el estudio de la conidiación en estas cepas, contribuirían a expandir el conocimiento que se tiene sobre la relación de ambos FTT respecto a la inducción del desarrollo asexual.

Discusión general.

Discusión general.

La conidiación en *A. nidulans* está regulada por dos vías genéticas principales, la ruta central o CDP, encargada del desarrollo de los tipos celulares que forman el conidióforo, y la ruta UDA, que regula la inducción de la ruta central (ver Introducción). Dentro de la ruta UDA, las proteínas FlbB, FlbE y FlbD se coordinan en un mecanismo de transducción que se caracteriza por la localización de FlbB en la punta de las hifas vegetativas, la cual depende de FlbE, y su transporte basipetal y acumulación en los núcleos, proceso que depende de la actividad FlbD. Debido a esta direccionalidad en la dinámica de FlbB, la localización en la punta del complejo FlbB/FlbE es un requisito previo para la actividad transcripcional del bZIP en el núcleo y, por lo tanto, la generación de conidios (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-García *et al.*, 2015). Por otro lado, la dependencia con respecto a FlbD de la acumulación nuclear de FlbB y su actividad transcripcional sugiere la existencia de una relación funcional compleja en el control de la expresión de ambos FTTT y su unión al promotor de *brlA*. Este control ejercido por FlbB y FlbD sobre *brlA* establece, además, una relación jerárquica con respecto al primer FT de la ruta CDP. Sin embargo, la inhibición de la expresión de *brlA* no es la única consecuencia de la ausencia de actividad FlbB. En esta tesis doctoral se ha demostrado que son varios los procesos celulares alterados en el mutante nulo del bZIP.

Balance entre ciclos reproductivos sexual y asexual.

En primer lugar, se ha determinado que FlbB regula la expresión de *urdA*, un gen necesario para la inhibición del ciclo sexual. La dependencia de la expresión de *urdA* con respecto a la actividad UDA, por un lado, y el fenotipo de su mutante nulo, en el que se observa un claro desplazamiento del balance entre ciclo asexual y sexual hacia la producción de cleistotecios, por el otro lado, relacionan a la ruta UDA con el control del desarrollo sexual.

Este caso, por tanto, se suma a otros previamente ya descritos de metabolitos y proteínas que controlan el balance entre ambos ciclos reproductivos.

Es conocido el caso de las moléculas lipogénicas *psiA*, *psiB* y *psiC*, colectivamente denominadas “factores *psi*” (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). De los tres genes identificados como genes de biosíntesis de oxilipinas en *A. nidulans* (ver Introducción), el RNA-seq analizado en esta tesis doctoral muestra que la expresión de uno de ellos, *ppoC*, es inhibida en ausencia de *flbB*, tanto en fase VG como AD. La delección de *ppoC* provoca una casi completa eliminación de la síntesis de la oxilipina *psiB β* , un aumento significativo de la producción de esporas meióticas y una disminución del desarrollo de conidiosporas (Tsitsigiannis *et al.*, 2004). Aunque no se conoce hoy en día relación alguna entre la ruta UDA y el control del balance sexual/asexual a través de la síntesis de oxilipinas, la confirmación de estos resultados preliminares mediante Northern-blot o qPCR sugeriría una posible dependencia de la ruta metabólica con respecto a la ruta UDA.

El caso de la proteína VeA y su control del balance entre los dos ciclos reproductivos a través del establecimiento de interacciones con otros tipos de reguladores y receptores de luz ha sido descrito en la Introducción. Un ejemplo adicional es *NsdD*, un FT necesario para activar el ciclo sexual y que, a su vez, regula negativamente el desarrollo asexual a través de la unión directa al promotor de *brlA* (Lee *et al.*, 2016). En el caso de *UrdA*, por su parte, los resultados obtenidos sugieren que la activación prematura del desarrollo sexual que se ha descrito para su mutante nulo no es consecuencia de una inducción temprana de *nsdD*. Por lo tanto, podría haber algún otro regulador del ciclo sexual jerárquicamente supeditado a la actividad *UrdA*. Esta hipotética diana es desconocida y podría avanzarse en su identificación a través de la combinación de un ChIPseq (Chung *et al.*, 2014), el cual, combina la técnica del ChiP con la secuenciación masiva de DNA asociado a proteínas, y la comparación transcriptómica de una cepa silvestre y el mutante nulo de *urdA*. Recientemente, ha sido publicada la caracterización

funcional de *OsaA*, un regulador transcripcional de la familia WOPR (Alkahyyat *et al.*, 2015). La delección de *OsaA* causa un fenotipo muy similar al del mutante $\Delta urdA$, lo cual sugiere que existen todavía más elementos de coordinación entre las redes transcripcionales que controlan los ciclos reproductivos en *A. nidulans*.

Ruta UDA y metabolismo secundario.

En segundo lugar, los resultados obtenidos han permitido establecer una relación entre la ausencia de actividad UDA y la desregulación de determinados *cluster-s* del metabolismo secundario. En el caso de los genes del *cluster dba*, estos aumentan su expresión en ausencia de varios de los genes que codifican los factores de la ruta UDA. Ello parece derivar, al menos en el caso de la cepa $\Delta flbB$, en una mayor viabilidad celular frente a la bacteria *M. luteus*, ya que, la delección de cualquier gen del *cluster* en un fondo $\Delta flbB$ anula este efecto. Esta hipótesis está apoyada por la observación de que el DHMBA, el metabolito asociado a este *cluster*, inhibe el crecimiento de dicha especie bacteriana (Gerke *et al.*, 2012). En cualquier caso, no parece que el DHMBA sea un metabolito necesario para la inducción de la conidiación o producido durante el proceso de esporulación, como pudieran ser el deshidroaustinol o la esterigmatocistina, respectivamente. Al contrario, tal y como se argumenta en la Discusión del capítulo 4, la ausencia de actividad UDA y de conidiación parecen generar un desajuste morfológico que activaría la expresión de los genes del *cluster dba* y la síntesis de metabolitos con una posible función de defensa.

En ambientes ricos en microorganismos potencialmente patógenos o que compitan por un mismo nicho, la supervivencia o patogenicidad de un organismo determinado depende de la eficiente detección de estos agentes y la rapidez en las respuestas de ataque o defensa (Ipcho *et al.*, 2016; Netzker *et al.*, 2015). Así, estudios transcriptómicos han mostrado que los hongos reaccionan a la presencia de bacterias activando la expresión de los *cluster* del metabolismo secundario (Gkarmiri *et al.*, 2015; Mathioni *et al.*, 2013; Schroeckh *et al.*, 2009). En

A. nidulans, por ejemplo, su cultivo con *Streptomyces rapamycinicus* induce un elevado número de genes contiguos que incluyen, al menos, dos *cluster* del metabolismo secundario, los definidos por las PKS An7903 (*dbal*) y An7909 (*orsA*), y un supuesto tercer *cluster* definido por la NRPS An7884 (Schroeckh *et al.*, 2009).

Entre los genes que componen el *cluster dba*, tres de ellos (*dbaB*, *dbaF* y *dbaH*) codifican proteínas que predictivamente contienen un péptido señal, lo que sugiere que podrían ir ancladas a membranas celulares o que podrían incorporarse a la ruta de secreción, cuya maquinaria está polarizada en *A. nidulans* y dirige los cargos hacia la punta de la hifa (Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2013; Pantazopoulou y Penalva, 2009). Entre las proteínas de este *cluster*, también se predice la presencia de una proteína, *dbaD*, transportadora de la superfamilia MFS (de las siglas en inglés: *major facilitator superfamily*). La presencia de genes que codifican este tipo de transportadores es típica en *cluster-s* del metabolismo secundario, ya que, promueven el tráfico de compuestos específicos entre orgánulos o participan en su exportación celular (Coleman y Mylonakis, 2009). Considerando la actividad que el *cluster dba* podría tener en la viabilidad de *A. nidulans* frente a otros microorganismos competidores (*M. luteus*), y debido al aumento de la expresión de sus genes en el mutante $\Delta flbB$, este fondo genético podría ser el adecuado para estudiar la localización de las proteínas correspondientes y el mecanismo a través del cual podría ser secretado el metabolito DHMBA.

Redes de regulación transcripcional.

Más allá de la participación de *urdA* y el *cluster dba* en el control del desarrollo y el metabolismo secundario, respectivamente, la técnica del RNA-seq y el diseño experimental utilizado han proporcionado una visión general de las relaciones que a nivel genético pueden existir entre elementos de una misma o diferentes redes de regulación. En términos generales, el control de la expresión génica se rige por grandes redes de regulación interconectadas entre sí (Davidson, 2010; Peter y Davidson, 2011), donde los FFTT tienen un papel principal de

coordinación (Jothi *et al.*, 2009). Para comprender el modelo de organización de estas redes transcripcionales hay que considerar dos tipos principales de estructura, la “autocrática” y la “democrática” (Bar-Yam *et al.*, 2009). La estructura estrictamente jerárquica o “autocracia molecular” se define como una organización en la que existen múltiples niveles de genes y su regulación está jerarquizada (Deplancke *et al.*, 2006; Yu y Gerstein, 2006). Una estructura “democrática” fuertemente interconectada sería, sin embargo, aquella en la cual todos los genes se regulan mutuamente (Bar-Yam *et al.*, 2009; Jothi *et al.*, 2009). Bar-Yam y colaboradores, junto con Jothi y colaboradores, propusieron que las redes transcripcionales de los sistemas celulares incorporaban características de organización de ambos tipos de estructuras (Bar-Yam *et al.*, 2009; Jothi *et al.*, 2009). Así, en este modelo de red intermedio, hay regulación mutua, pero también hay relaciones jerárquicas entre los genes. Esto significa que unos pocos FTT altamente influyentes, denominados reguladores globales, controlan, directamente o a través de otros FTT, la expresión de un número elevado de genes, mientras que la mayoría de FTT, los reguladores específicos de ruta, regula la expresión de un número limitado de genes. Por ello, el efecto de la delección de un gen es siempre relativo a su importancia en la red o redes de las que forma parte y al número de genes regulados por él.

El tratamiento estadístico de los resultados de secuenciación sugiere que la ausencia de actividad FlbB puede afectar significativamente a la expresión de 1168 genes en la fase VG y 386 en la fase AD. De ellos, más de 45 están anotados como genes que codifican FTT. Considerando que, según Wortman y colaboradores, el genoma de *A. nidulans* codifica 490 posibles FTT (Wortman *et al.*, 2009), este número podría suponer casi el 10% del total de FTT de este organismo. De los 45 FTT, 20 pertenecen a la familia del tipo Zn(II)₂Cys₆, los cuales suelen actuar como reguladores específicos de ruta y cuya actividad suele estar subordinada con respecto a la de los reguladores globales (Todd y Andrianopoulos, 1997).

Además de una confirmación experimental de los cambios en la expresión de estos FFTT en el mutante nulo de *flbB*, la continuación de esta línea de trabajo debería determinar si esta regulación puede ser por unión directa a los promotores de estos genes o si es indirecta. Para ello, habría que realizar de forma individual experimentos de retardo en gel (EMSA; del inglés, *electrophoretic mobility shift assay*) (Fried y Crothers, 1981; Garner y Revzin, 1981) o inmunoprecipitación de cromatina (ChIP; del inglés, *chromatin immunoprecipitation*) (Orlando *et al.*, 1997). También podrían emplearse técnicas masivas como el ChIPseq (Chung *et al.*, 2014), pudiendo ser utilizado para mapear de una forma precisa los sitios de unión a DNA de cualquier FT de interés. La integración de los resultados del ChIP-seq y los del RNA-seq contribuiría a determinar las redes de regulación en las que participa FlbB y el tipo de relación (jerárquica o democrática) que presenta respecto a los FFTT que controlan dichas rutas. Resultados previos y aquellos obtenidos en esta tesis doctoral han mostrado que FlbB establece una relación dual con FlbD, ya que, controla su expresión pero a su vez se coordina con él para regular a *brlA*. El propio *brlA* y también *urdA* están, sin embargo, sometidos al control jerárquico de los UDAs. Entre los genes del *cluster dba* también se encuentran *dbaA*, que codifica un FT tipo Zn(II)₂Cys₆, y *dbaG*, el cual, debido a su homología con *afu4g00710* de *A. fumigatus*, probablemente también codifique un FT que pertenece a la misma familia de reguladores transcripcionales (Gerke *et al.*, 2012). Ambos, además de codificar reguladores específicos de ruta (Todd y Andrianopoulos, 1997), están sometidos a la actividad UDA. Así, se puede proponer que FlbB participa en redes tanto democráticas como jerárquicas.

Comunicación punta-núcleo y regulación transcripcional de la conidiación en *A. nidulans*.

La localización apical de FlbB es un requisito previo a la inducción de la expresión de *brlA* en el núcleo (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Su posterior migración desde la punta al núcleo comprende, a priori, dos etapas secuenciales: transporte basipetal e importación al núcleo. Esta tesis doctoral ofrece resultados preliminares, principalmente, en torno al papel en la

acumulación nuclear de FlbB de uno de sus dominios funcionales (NLS) y el FT FlbD. Dichos resultados se resumen, a continuación, en un modelo que se divide en dos etapas principales: 1) migración de FlbB desde la punta de la hifa vegetativa y acumulación en el núcleo y 2) regulación transcripcional.

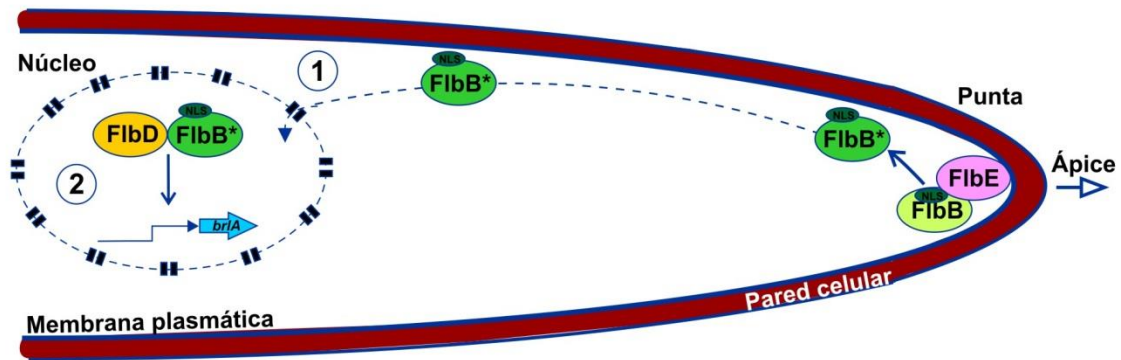


Figura 6.1. Modelo para la dinámica basipetal y actividad transcripcional de FlbB en hifas vegetativas. Se representan las dos etapas principales: 1) Migración desde la punta de la hifa vegetativa al núcleo, la cual, es probablemente MT-dependiente. El dominio NLS de FlbB (Herrero-García *et al.*, 2015) y FlbD juegan un papel central en la acumulación nuclear. 2) Regulación transcripcional. Unión de FlbB y FlbD al promotor de *brlA* y control de su expresión (Garza *et al.*, 2010).

Transporte basipetal y acumulación nuclear de FlbB.

Los resultados obtenidos con las cepas que contienen las mutaciones K67A y R68A, así como la similitud de la secuencia situada entre los aminoácidos K57 y G70 con una secuencia bipartita consenso de localización nuclear, apoyan la hipótesis de que dicho dominio de FlbB, al que denominamos NLS, es clave en su acumulación nuclear. Estas observaciones permiten especular sobre una posible relación funcional de FlbB con el dímero importina α/β , KapA/KapB en *A. nidulans*, tal y como se sugiere en la Discusión del capítulo 5. Dicha hipotética relación podría desglosarse en dos opciones posibles. En primer lugar, el dímero KapA/KapB podría ser necesario para el transporte punta-núcleo de FlbB. Esta posibilidad viene apoyada por el hecho de que KapA y KapB muestran un movimiento citoplásmico simultáneo,

bidireccional y MT-dependiente entre zonas distales de las hifas y la punta (Etxebeste *et al.*, 2013). En segundo lugar, a pesar de su dinámica citoplásmica, KapA y KapB podrían no ser necesarios para el transporte basipetal de FlbB y limitarse a la importación al núcleo. Experimentos que ayudarían a determinar cuál de las dos posibilidades es la real han sido también propuestos en la Discusión del capítulo 5.

El primer caso establecería nuevas similitudes en comparación con otros tipos de células polarizadas donde el papel desempeñado por las importinas- α / β en el transporte basipetal de larga distancia de cargos juega un papel importante (Hanz *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004). Ello demuestra que la actividad de las carioferinas en eucariotas no se limita exclusivamente a la periferia nuclear. En neuronas se ha descrito la existencia de FFTT y co-reguladores sinápticos o localizados en el cono axonal que son también cargos de las importinas- α y β (Ben-Yaakov *et al.*, 2012; Panayotis *et al.*, 2015). Dichos mecanismos de señalización entre los sitios de polaridad y el núcleo neuronal son esenciales en el control de diversos procesos y respuestas celulares (Ji y Jaffrey, 2014; Karpova *et al.*, 2012). En neuronas, por ejemplo, el mRNA de la importina- β se acumula de forma asimétrica en axones mientras que la importina- α se encuentra en los axones en asociación constitutiva con el motor retrógrado dineina. Después de una lesión, el mRNA de la importina- β se traduce a nivel local en el sitio de la lesión y esto conduce a la formación de heterodímeros importina β 1/ α unidos a la dineina, los cuales transportan activamente cargos de señalización al núcleo (Hanz *et al.*, 2003). De forma similar, KapA y KapB podrían también tener un papel importante en el transporte a larga distancia de cargos entre punta y núcleos de las hifas de *A. nidulans*, a través de la recepción de señales específicas y la formación de complejos de señalización. A pesar de las similitudes en la dinámica citoplasmática de los homólogos de las importinas- α y β en hifas y neuronas (Etxebeste *et al.*, 2013), el análisis de esta hipótesis requeriría la realización de experimentos adicionales como la localización de los respectivos mRNAs o la identificación de posibles cargos de las fracciones citoplásmicas de ambas carioferinas.

La movilidad citoplásmica de FlbB depende de la actividad FlbD, ya que esta aumenta al deletar a *flbD*. Por ello, el fondo genético $\Delta flbD$ puede ofrecer una herramienta útil para identificar elementos adicionales necesarios en el transporte basipetal del bZIP. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran un movimiento bidireccional y sugieren que éste es MT-dependiente. A pesar de la todavía limitada intensidad en la fluorescencia de FlbB en este fondo genético, su movimiento citoplásmico podría considerarse cualitativamente similar al descrito para la dinámica subcelular de los endosomas que contienen la proteína RabA (Abenza *et al.*, 2009). Las GTPasas de familia Rab están ancladas a la membrana mediante los grupos prenilo de su extremo C-terminal y por su capacidad para reclutar, en la conformación unida a GTP, efectores específicos a sus membranas, son los principales determinantes de la identidad de los endosomas (Behnia y Munro, 2005; Zerial y McBride, 2001). En el caso de RabA, ha sido propuesto que la población de endosomas correspondiente podría transportar, a su vez, poblaciones de KapA y KapB (Etxebeste *et al.*, 2013). Así, una hipotética relación entre el transporte basipetal de FlbB, las importinas KapA y KapB y el transporte en endosomas es una posibilidad a estudiar en el futuro.

Debe considerarse, por otro parte, que la delección de *flbD* deriva en la ausencia de la acumulación nuclear de FlbB mientras que su sobreexpresión parece aumentarla. La única localización subcelular descrita hasta el momento para FlbD en hifas vegetativas es nuclear (Garzia *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2014), lo cual, lleva a sugerir que su papel no está relacionado con el transporte basipetal de FlbB, sino con su retención en el núcleo. Ello, a su vez, abre la puerta a una posible interacción entre ambos FFTT, la cual, se apoya por el momento en la capacidad de la quimera GST::FlbB de retener a FlbD::HA_{3x} en los ensayos de *pull-down*. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas observaciones, se propone que FlbB y FlbD podrían interactuar en el núcleo, pudiendo ser éste el mecanismo de retención de FlbB. En cualquier caso, esta hipótesis requeriría, en primer lugar, confirmar que la sobreexpresión de FlbD va acompañada también de un aumento significativo de su propia localización nuclear.

Control transcripcional de la expresión de *brlA* a través de FlbB y FlbD.

Las primeras publicaciones sobre los genes *flb* ya mostraron una clara disminución de la expresión de *brlA* en sus mutantes de pérdida de función (*flb⁻*) (Wieser *et al.*, 1994). Trabajos posteriores describieron que, tras 4-6 horas desde la inducción de la conidiación, *flbB* y *flbD* presentaban un pico de expresión que precedía a la de *brlA* (Etxebeste *et al.*, 2008; Garzia *et al.*, 2010). Resultados basados en experimentos de unión proteína-DNA demostraron que tanto FlbB como FlbD se unían a un fragmento de 300 nt-s del promotor de *brlA* (Garzia *et al.*, 2010). Una búsqueda dentro de este fragmento de promotor de secuencias similares a las consenso para la unión de FFTT del tipo bZIP y c-Myb permitió predecir posibles secuencias diana tanto para FlbB como para FlbD, de modo que la hipotética diana de FlbB estaría situada entre las dos posibles dianas de FlbD (Garzia *et al.*, 2010). Sin embargo, la unión a dichas secuencias no ha sido confirmada aún (Garzia *et al.*, 2010). El análisis mediante la técnica ChIP de esa región de 300 nt-s mostró que la unión de FlbB se inhibía en un fondo mutante $\Delta flbD$ (Garzia *et al.*, 2010), probablemente, tal y como se ha descrito en este trabajo, como consecuencia de la ausencia de acumulación nuclear de FlbB en ese fondo genético. Los experimentos de EMSA, por su parte, mostraron que cada FT es capaz de unir al promotor de *brlA* de forma independiente (Garzia *et al.*, 2010). Por lo tanto, aun siendo un resultado de análisis *in vitro*, dicha unión a DNA podría indicar que FlbB y FlbD no se requieren el uno al otro para unir al DNA. Teniendo en cuenta estas observaciones, junto al resto de resultados acerca de la relación funcional entre FlbB y FlbD obtenidas en esta tesis doctoral, se abre la posibilidad de especular sobre diferentes modelos posibles de regulación transcripcional o cooperatividad entre ambos FFTT en el núcleo (Siggers y Gordan, 2014).

Uno de los modelos posibles que incluye la unión a DNA sin interacción entre los FFTT es el basado en los FFTT pioneros (Zaret y Carroll, 2011). Los FFTT pioneros reclutan complejos de remodelación de la cromatina que conducen al reposicionamiento del nucleosoma a fin de

aumentar la accesibilidad y unión de otros FTT que sin dicha remodelación no podrían acceder a sus sitios diana (Magnani *et al.*, 2011;Soufi *et al.*, 2015;Spitz y Furlong, 2012). Otro escenario posible es el modelo de regulación coordinado, el cual, ya ha sido previamente propuesto para FTT del tipo bZIP y c-Myb (Tahirov *et al.*, 2002). Este modelo propone una unión previa e independiente al DNA de cada FT y posterior interacción entre ambos FTT (Andronis *et al.*, 2008;Tahirov *et al.*, 2002). En el caso descrito por Tahirov *et al.* (2002), los autores analizaron el sistema de regulación transcripcional formado por las proteínas c-Myb y B/EBP β , un c-Myb y un bZIP, respectivamente, que controlan conjuntamente la transcripción de genes específica de células mieloides (Lipsick y Wang, 1999). Los autores describen la cadena de eventos necesarios para la inducción del gen diana. En primer lugar, la proteína c-Myb une al DNA y después el bZIP une el complejo c-Myb-DNA, generando el complejo bZIP-cMYb-DNA. Este complejo requiere de la formación de un bucle en el DNA que deriva en la activación sinérgica de la expresión del gen diana (Tahirov *et al.*, 2002).

Para la elucidación del mecanismo transcripcional a través del cual FlbB y FlbD controlan la expresión de *brlA* y conocer si hay unión a DNA antes o después de la hipotética interacción entre ellos habría que determinar, en primer lugar, la secuencia diana de cada FT en el promotor de *brlA*. Para ello, habría que acotar las secuencias dianas para cada FT mediante EMSA o ChIP, confirmando o no su coincidencia con las secuencias predichas. Una vez conocidas las dianas de cada FT, se incluirían mutaciones en éstas y se repetirían los experimentos de retardo en gel para confirmar la pérdida de unión (Espeso y Penalva, 1996). La determinación de las secuencias diana permitirá no sólo realizar análisis que se describirán a continuación sino además conocer su posición relativa (“*motif grammar*” o “*motif positioning*”) en el promotor de *brlA*, un factor relevante en muchos mecanismos de regulación (Senger *et al.*, 2004;Swanson *et al.*, 2010;Tahirov *et al.*, 2002). Conocer las distancias entre ambas secuencias diana permitiría analizar, por ejemplo, si ambos FTT se situarían al mismo lado de la doble hebra o estudiar si podrían establecer una interacción

directa o necesitarían una conformación específica del DNA para interactuar (Spitz y Furlong, 2012).

La generación de cepas con mutaciones en las dianas unidas por FlbB, FlbD o ambos en el promotor de *brlA* permitiría analizar si la unión de ambos FFTT al DNA es necesaria para su retención en el núcleo, la relación de esta retención con su interacción y por supuesto, la importancia de esta retención en la inducción de la conidiación. Estos resultados, junto con los obtenidos en los experimentos de mutagénesis de *flbD* (ver Discusión del Capítulo 5) y los presentados en esta tesis doctoral podrían completar la caracterización del mecanismo de unión de FlbB y FlbD al promotor de *brlA* en la fase vegetativa.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la unión de FlbB y FlbD al promotor de *brlA* descrita al inicio de esta sección se analizó en hifas vegetativas (Garzia *et al.*, 2010), es decir, antes de la inducción de la conidiación. Por lo tanto, la unión de ambos FFTT al promotor del primer gen de la ruta CDP no es suficiente para reprogramar las hifas vegetativas. Una posibilidad es que la configuración de los FFTT en el promotor de *brlA* varíe durante las distintas fases de desarrollo, tal y como proponen (Lee *et al.*, 2016). Por ello, sería conveniente repetir los experimentos de CHIP utilizando muestras recogidas durante la reproducción asexual, para ver si se mantienen los sitios de unión de los FFTT o varía la afinidad de cada FFTT por su diana en el promotor de *brlA*. Después de la inducción de la conidiación, hay un aumento en la transcripción de *flbB* (Etxebeste *et al.*, 2008) y los niveles de proteína FlbB (comunicación personal de Elixabet Perez de Nanclares Arregi). Ese aumento en los niveles de proteína FlbB podría llevar a sugerir que la cantidad de proteína unida a DNA pudiese ser crítica para la inducción de la expresión de *brlA* (modelo aditivo, es decir, la activación es proporcional a la concentración del FT y el grado de ocupación de sus sitios de unión en el DNA) (Giorgetti *et al.*, 2010). Pero la expresión de *brlA* depende de la actividad de multitud de FFTT (Lee *et al.*, 2016). Por lo tanto, el aumento de la cantidad de FlbB y FlbD unidos a su

promotor, combinado con la modificación de los co-reguladores, podrían ser los modulares del mecanismo de unión a DNA, induciendo la síntesis del conidióforo.

En resumen, el transporte basipetal se daría sobre filamentos de tubulina y la acumulación nuclear de FlbB requiere, al menos, el dominio NLS de FlbB y una forma funcional de FlbD. Una vez en el núcleo, ambos FTTT interaccionarían y unirían al promotor de *brlA* de forma cooperativa, aunque se desconoce actualmente en qué orden tienen lugar estos eventos. Además del control de la conidiación, la actividad UDA está relacionada a través de UrdA con el balance entre los ciclos sexual y asexual, y a través del *cluster dba* con el metabolismo secundario.

Conclusiones.

Conclusiones:

Tras los experimentos realizados y los resultados obtenidos, las principales conclusiones que se pueden obtener de este trabajo son las siguientes:

- 1) Una probable NLS es esencial para la acumulación nuclear de FlbB en hifas vegetativas.
- 2) Los niveles de FlbD (probablemente en su forma nuclear) regulan la cantidad de FlbB acumulada en los núcleos. En ausencia de FlbD, FlbB queda en el citoplasma y describe un movimiento bidireccional que aparentemente depende del citoesqueleto de tubulina.
- 3) La actividad transcripcional de FlbB es necesaria no sólo para la inducción de la conidiación sino que actúa sobre otras redes de regulación adicionales.
- 4) La ausencia de *flbB* desregula la transcripción de diversos *cluster* del metabolismo secundario. La expresión del *cluster dba*, cuya presencia en el genoma de *A. nidulans* es probablemente consecuencia de un proceso de transferencia horizontal de genes desde *T. stipitatus*, aumenta la viabilidad de *A. nidulans* ante especies bacterianas como *M. luteus*.
- 5) FlbB regula el balance entre los ciclos de reproducción asexual y sexual a través de UrdA. La ausencia de *urdA* provoca una disminución en la conidiación y un aumento en la formación de cleistotecios, por lo que se postula como un FT represor del ciclo sexual.

Bibliografía.

Bibliografía:

Abenza,J.F., Galindo,A., Pinar,M., Pantazopoulou,A., de,L.R., V, and Penalva,M.A. (2012) Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* **23**: 1889-1901.

Abenza,J.F., Pantazopoulou,A., Rodriguez,J.M., Galindo,A., and Penalva,M.A. (2009) Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**: 57-75.

Adams,T.H., Boylan,M.T., and Timberlake,W.E. (1988) brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362.

Adams,T.H., Deising,H., and Timberlake,W.E. (1990) brlA requires both zinc fingers to induce development. *Mol Cell Biol* **10**: 1815-1817.

Adams,T.H., Wieser,J.K., and Yu,J.-H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35-54.

Aguirre,J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus* brlA developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* **8**: 211-218.

Aguirre,J., Rios-Momberg,M., Hewitt,D., and Hansberg,W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111-118.

Ahuja,M., Chiang,Y.M., Chang,S.L., Praseuth,M.B., Entwistle,R., Sanchez,J.F. *et al.* (2012) Illuminating the Diversity of Aromatic Polyketide Synthases in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **134**: 8212-8221.

Alkhatyat,F., Ni,M., Kim,S.C., and Yu,J.H. (2015) The WOPR Domain Protein OsaA Orchestrates Development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **10**: e0137554.

Alkhatyat,F., and Yu,J.H. (2014) Upstream regulation of mycotoxin biosynthesis. *Adv Appl Microbiol* **86**: 251-278.

Alves,P.C., Hartmann,D.O., Nunez,O., Martins,I., Gomes,T.L., Garcia,H. *et al.* (2016) Transcriptomic and metabolomic profiling of ionic liquid stimuli unveils enhanced secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* **17**: 284.

Andrianopoulos,A., and Timberlake,W.E. (1991) ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**: 747-748.

Andronis,C., Barak,S., Knowles,S.M., Sugano,S., and Tobin,E.M. (2008) The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**: 58-67.

Araujo-Bazan,L., Dhingra,S., Chu,J., Fernandez-Martinez,J., Calvo,A.M., and Espeso,E.A. (2009) Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**: 506-515.

- Araujo-Bazan,L, Fernandez-Martinez,J., Rios,V.M., Etxebeste,O., Albar,J.P., Penalva,M.A., and Espeso,E.A. (2008a) NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin alpha. *Fungal Genet Biol* **45**: 278-291.
- Araujo-Bazan,L, Penalva,M.A., and Espeso,E.A. (2008b) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67**: 891-905.
- Asano,Y., Hagiwara,D., Yamashino,T., and Mizuno,T. (2007) Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1800-1803.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M. *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29.
- Baidya,S., Cary,J.W., Grayburn,W.S., and Calvo,A.M. (2011) Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5524-5528.
- Baker,K.E., and Parker,R. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 293-299.
- Bar-Yam,Y., Harmon,D., and de,B.B. (2009) Systems biology. Attractors and democratic dynamics. *Science* **323**: 1016-1017.
- Barbosa,C., Peixeiro,I., and Romao,L. (2013) Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet* **9**: e1003529.
- Bartnicki-Garcia,S. (2002) Hyphal tip growth: outstanding questions. In *Molecular Biology of Fungal Development*. HD Osiewacz (ed). New York: Marcel Dekker, pp. 29-58.
- Bayram,O., Bayram,O.S., Ahmed,Y.L., Maruyama,J., Valerius,O., Rizzoli,S.O. *et al.* (2012) The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet* **8**: e1002816.
- Bayram,O., and Braus,G.H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1-24.
- Bayram,O., Braus,G.H., Fischer,R., and Rodriguez-Romero,J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**: 900-908.
- Beever,R.E., and Dempsey,G.P. (1978) Function of rodlets on the surface of fungal spores. *Nature* **272**: 608-610.
- Behnia,R., and Munro,S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**: 597-604.
- Ben-Yaakov,K., Dagan,S.Y., Segal-Ruder,Y., Shalem,O., Vuppalachchi,D., Willis,D.E. *et al.* (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* **31**: 1350-1363.

- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**: 279-284.
- Berepiki, A., Lichius, A., and Read, N.D. (2011) Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**: 876-887.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J., and De Croos, J.N. (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Appl Environ Microbiol* **67**: 1335-1342.
- Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J., and Steinberg, G. (2014) Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**: 5097.
- Birse, C.E., and Clutterbuck, A.J. (1991) Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase-encoding gene, *ivoB*. *Gene* **98**: 69-76.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R., and Timberlake, W.E. (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**: 3113-3118.
- Boyle, P., and Despres, C. (2010) Dual-function transcription factors and their entourage: unique and unifying themes governing two pathogenesis-related genes. *Plant Signal Behav* **5**: 629-634.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brakhage, A.A. (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**: 21-32.
- Bromann, K., Toivari, M., Viljanen, K., Vuoristo, A., Ruohonen, L., and Nakari-Setälä, T. (2012) Identification and characterization of a novel diterpene gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e35450.
- Calvo, A.M., and Cary, J.W. (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front Microbiol* **6**: 62.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447-59, table.
- Calvo, A.M., Lohmar, J.M., Ibarra, B., and Satterlee, T. (2016) 18 Velvet Regulation of Fungal Development. In *Growth, Differentiation and Sexuality*. Wendland, J.+ (ed). Cham: Springer International Publishing, pp. 475-497.
- Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., and Mootha, V.K. (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7507-7512.
- Casselton, L., and Zolan, M. (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* **3**: 683-697.
- Castillo, E.A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J. *et al.* (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* **45**: 243-254.

- Chang, Y.C., and Timberlake, W.E. (1993) Identification of *Aspergillus* brlA response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* **133**: 29-38.
- Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Nayak, T., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.C. *et al.* (2008) Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chem Biol* **15**: 527-532.
- Chung, D., Barker, B.M., Carey, C.C., Merriman, B., Werner, E.R., Lechner, B.E. *et al.* (2014) ChIP-seq and in vivo transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS Pathog* **10**: e1004487.
- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-1995.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Coleman, J.J., and Mylonakis, E. (2009) Efflux in fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog* **5**: e1000486.
- Corrochano, L.M. (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 725-736.
- Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* **6**: e17505.
- Cox, R.J. (2007) Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org Biomol Chem* **5**: 2010-2026.
- Davidson, E.H. (2010) Emerging properties of animal gene regulatory networks. *Nature* **468**: 911-920.
- de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., and Klis, F.M. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S72-S81.
- de Souza, C.C., Pellizzon, C.H., Hiraishi, M., Goldman, M.H., and Goldman, G.H. (1998) Isolation and characterisation of cycloheximide-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **33**: 60-69.
- De Souza, C.P., Hashmi, S.B., Osmani, A.H., Andrews, P., Ringelberg, C.S., Dunlap, J.C., and Osmani, S.A. (2013) Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One* **8**: e58008.
- Deplancke, B., Mukhopadhyay, A., Ao, W., Elewa, A.M., Grove, C.A., Martinez, N.J. *et al.* (2006) A gene-centered *C. elegans* protein-DNA interaction network. *Cell* **125**: 1193-1205.
- Dyer, P.S., and O'Gorman, C.M. (2012) Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 165-192.
- Egan, M.J., McClintock, M.A., and Reck-Peterson, S.L. (2012) Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**: 637-645.

- Espeso, E.A., and Penalva, M.A. (1996) Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem* **271**: 28825-28830.
- Etxebeste, O. Nuevos genes involucrados en la inducción de la conidiación en *Aspergillus nidulans*. 2008.
- Etxebeste, O., and Espeso, E.A. (2016) Neurons show the path: tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 610-624.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569-576.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araujo-Bazan, L., Rodriguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2009a) The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73**: 775-789.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Cortese, M.S., Garzia, A., Oiartzabal-Arano, E., de, L.R., V *et al.* (2012) GmcA Is a Putative Glucose-Methanol-Choline Oxidoreductase Required for the Induction of Asexual Development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e40292.
- Etxebeste, O., Markina-Inarrairaegui, A., Garzia, A., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2009b) Kap1, a non-essential member of the Pse1p/Imp5 karyopherin family, controls colonial and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **155**: 3934-3945.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.-H. *et al.* (2008) Basic-Zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7**: 38-48.
- Etxebeste, O., Villarino, M., Markina-Inarrairaegui, A., Araujo-Bazan, L., and Espeso, E.A. (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *PLoS One* **8**: e85076.
- Fischer, R. (2014) Promiscuity breeds diversity: the role of polyketide synthase in natural product biosynthesis. *Chem Biol* **21**: 701-702.
- Fischer, R., and Kües, U. (2006) Asexual Sporulation in Mycelial Fungi Growth, Differentiation and Sexuality. Kües, U., and Fischer, R. (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 263-292.
- Fiserova, J., and Goldberg, M.W. (2010) Nucleocytoplasmic transport in yeast: a few roles for many actors. *Biochem Soc Trans* **38**: 273-277.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186-194.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I., and Kobe, B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J Biol Chem* **278**: 27981-27987.
- Fox, E.M., and Howlett, B.J. (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol* **11**: 481-487.

- Freitas,N., and Cunha,C. (2009) Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics* **10**: 550-557.
- Fried,H., and Kutay,U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1659-1688.
- Fried,M., and Crothers,D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Garner,M.M., and Revzin,A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.
- Garzia,A. Mecanismos Moleculares de la Inducción de la Esporulación en *Aspergillus nidulans*. 2011.
- Garzia,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Fischer,R., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172-184.
- Garzia,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Ugalde,U., and Espeso,E.A. (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314-1324.
- Garzia,A., Etxebeste,O., Rodriguez-Romero,J., Fischer,R., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2013) Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **12**: 311-321.
- Geiser,D.M., Gueidan,C., Miadlikowska,J., Lutzoni,F., Kauff,F., Hofstetter,V. *et al.* (2006) Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia* **98**: 1053-1064.
- Geiser,D.M., Timberlake,W.E., and Arnold,M.L. (1996) Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol Biol Evol* **13**: 809-817.
- Gerke,J., Bayram,O., Feussner,K., Landesfeind,M., Shelest,E., Feussner,I., and Braus,G.H. (2012) Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8234-8244.
- Giorgetti,L., Siggers,T., Tiana,G., Caprara,G., Notarbartolo,S., Corona,T. *et al.* (2010) Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. *Mol Cell* **37**: 418-428.
- Gkarmiri,K., Finlay,R.D., Alstrom,S., Thomas,E., Cubeta,M.A., and Hogberg,N. (2015) Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia proteamaculans* and *Serratia plymuthica*. *BMC Genomics* **16**: 630.
- Glass,N.L., Jacobson,D.J., and Shiu,P.K. (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu Rev Genet* **34**: 165-186.
- Glass,N.L., Rasmussen,C., Roca,M.G., and Read,N.D. (2004) Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol* **12**: 135-141.

- Glover, J.N., and Harrison, S.C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**: 257-261.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S.A. (2004) Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**: 505-514.
- Gorlich, D., and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-660.
- Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W., and Kratky, C. (1998) Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies. *Biochemistry* **37**: 13475-13485.
- Grunbacher, A., Throm, T., Seidel, C., Gutt, B., Rohrig, J., Strunk, T. *et al.* (2014) Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* **9**: e94546.
- Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Chae, K.S., Jahng, K.Y., and Han, D.M. (2001) The nsdD gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**: 299-309.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R.A., and Adams, T.H. (1993) Translational repression of brlA expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12**: 2449-2457.
- Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.Q., Massarwa, R., Huerta, J.J. *et al.* (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* **40**: 1095-1104.
- Harris, S.D. (2001) Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 736-739.
- Harris, S.D. (2009) The Spitzenkorper: a signalling hub for the control of fungal development? *Mol Microbiol* **73**: 733-736.
- Harris, S.D., and Momany, M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* **41**: 391-400.
- Hellauer, K., Akache, B., MacPherson, S., Sirard, E., and Turcotte, B. (2002) Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the PDR5 gene encoding a multidrug transporter. *J Biol Chem* **277**: 17671-17676.
- Herrero-Garcia, E. Desarrollo asexual en *Aspergillus nidulans*: regulación molecular y celular de la actividad del bZIP FIB. 2013.
- Herrero-Garcia, E., Garzia, A., Cordobes, S., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2011) 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol* **115**: 393-400.
- Herrero-Garcia, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Cortese, M.S., Markina-Inarriaga, A., Oiartzabal-Arano, E., Etxebeste, O. *et al.* (2015) Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol Microbiol* **98**: 607-624.
- Hickey, P.C., Jacobson, D., Read, N.D., and Louise Glass, N.L. (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **37**: 109-119.

- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., and Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**: 4916-4923.
- Holmstrom, K.M., and Finkel, T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 411-421.
- Hood, H.M., Neafsey, D.E., Galagan, J., and Sachs, M.S. (2009) Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. *Annu Rev Microbiol* **63**: 385-409.
- Hood, J.K., and Silver, P.A. (1998) Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 35142-35146.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002) Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* **9**: 789-798.
- Inglis, D.O., Binkley, J., Skrzypek, M.S., Arnaud, M.B., Cerqueira, G.C., Shah, P. *et al.* (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol* **13**: 91.
- Ipcho, S., Sundelin, T., Erbs, G., Kistler, H.C., Newman, M.A., and Olsson, S. (2016) Fungal Innate Immunity Induced by Bacterial Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *G3 (Bethesda)* **6**: 1585-1595.
- Jansen, R.P., Niessing, D., Baumann, S., and Feldbrugge, M. (2014) mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet* **30**: 408-417.
- Ji, S.J., and Jaffrey, S.R. (2014) Axonal transcription factors: novel regulators of growth cone -to-nucleus signaling. *Dev Neurobiol* **74**: 245-258.
- Jin, F.J., Nishida, M., Hara, S., and Koyama, Y. (2011a) Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix transcription factor involved in the early stage of conidiophore development in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* **48**: 1108-1115.
- Jin, F.J., Takahashi, T., Matsushima, K., Hara, S., Shinohara, Y., Maruyama, J. *et al.* (2011b) SclR, a basic helix-loop-helix transcription factor, regulates hyphal morphology and promotes sclerotial formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* **10**: 945-955.
- Jothi, R., Balaji, S., Wuster, A., Grochow, J.A., Gsponer, J., Przytycka, T.M. *et al.* (2009) Genomic analysis reveals a tight link between transcription factor dynamics and regulatory network architecture. *Mol Syst Biol* **5**: 294.
- Kafer, E. (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217-232.
- Karpova, A., Bar, J., and Kreutz, M.R. (2012) Long-distance signaling from synapse to nucleus via protein messengers. *Adv Exp Med Biol* **970**: 355-376.
- Keeling, P.J., and Palmer, J.D. (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* **9**: 605-618.
- Kelly, D.E., Krasevec, N., Mullins, J., and Nelson, D.R. (2009) The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S53-S61.

- Khaldi,N., Seifuddin,F.T., Turner,G., Haft,D., Nierman,W.C., Wolfe,K.H., and Fedorova,N.D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet Biol* **47**: 736-741.
- Konzack,S., Rischitor,P.E., Enke,C., and Fischer,R. (2005) The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 497-506.
- Kumar,S., Tamura,K., and Nei,M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150-163.
- Kwon,N.J., Garzia,A., Espeso,E.A., Ugalde,U., and Yu,J.H. (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203-1219.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange,A., Mills,R.E., Lange,C.J., Stewart,M., Devine,S.E., and Corbett,A.H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**: 5101-5105.
- Larsen,D.M., Nyffenegger,C., Swiniarska,M.M., Thygesen,A., Strube,M.L., Meyer,A.S., and Mikkelsen,J.r.D. (2015) Thermostability enhancement of an endo-1,4- α -D-galactanase from *Talaromyces stipitatus* by site-directed mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 4245-4253.
- Law,D.J., and Timberlake,W.E. (1980) Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **144**: 509-517.
- Lee,B.N., and Adams,T.H. (1994) The *Aspergillus nidulans* fluG gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**: 641-651.
- Lee,B.N., and Adams,T.H. (1996) FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA beta activation. *EMBO J* **15**: 299-309.
- Lee,M.K., Kwon,N.J., Choi,J.M., Lee,I.S., Jung,S., and Yu,J.H. (2014) NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **197**: 159-173.
- Lee,M.K., Kwon,N.J., Lee,I.S., Jung,S., Kim,S.C., and Yu,J.H. (2016) Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep* **6**: 28874.
- Lipsick,J.S., and Wang,D.M. (1999) Transformation by v-Myb. *Oncogene* **18**: 3047-3055.
- Lo,H.C., Entwistle,R., Guo,C.J., Ahuja,M., Szewczyk,E., Hung,J.H. *et al.* (2012) Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **134**: 4709-4720.
- Lo,P.L., Lanver,D., Schweizer,G., Tanaka,S., Liang,L., Tollot,M. *et al.* (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 513-545.

- Lomer,C.J., Bateman,R.P., Johnson,D.L., Langewald,J., and Thomas,M. (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol* **46**: 667-702.
- Magnani,L., Eeckhoutte,J., and Lupien,M. (2011) Pioneer factors: directing transcriptional regulators within the chromatin environment. *Trends Genet* **27**: 465-474.
- Mah,J.H., and Yu,J.H. (2006) Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **5**: 1585-1595.
- Markina-Inarrairaegui,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Araujo-Bazan,L., Fernandez-Martinez,J., Flores,J.A. *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **22**: 3874-3886.
- Markina-Inarrairaegui,A., Pantazopoulou,A., Espeso,E.A., and Penalva,M.A. (2013) The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS One* **8**: e67154.
- Marshall,M.A., and Timberlake,W.E. (1991) *Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**: 55-62.
- Marsit,S., Mena,A., Bigey,F., Sauvage,F.X., Couloux,A., Guy,J. *et al.* (2015) Evolutionary Advantage Conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Event in Wine Yeasts. *Mol Biol Evol* **32**: 1695-1707.
- Martinelli,S.D., and Kinghorn,J.R. (1994) *Aspergillus*: 50 years on. Elsevier.
- Mathioni,S.M., Patel,N., Riddick,B., Sweigard,J.A., Czymmek,K.J., Caplan,J.L. *et al.* (2013) Transcriptomics of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in response to the bacterial antagonist *Lysobacter* enzymogenes reveals candidate fungal defense response genes. *PLoS One* **8**: e76487.
- Mims,C.W., Richardson,W.D., and Timberlake,W.E. (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **244**: 132-141.
- Mirabito,P.M., Adams,T.H., and Timberlake,W.E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859-868.
- Momany,M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 580-585.
- Mooney,J.L., and Yager,L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473-1482.
- Mortazavi,A., Williams,B.A., McCue,K., Schaeffer,L., and Wold,B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**: 621-628.
- Morton,A.G. (1961) The Induction of Sporulation in Mould Fungi. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **153**: 548.

- Nahlik,K., Dumkow,M., Bayram,O., Helmstaedt,K., Busch,S., Valerius,O. *et al.* (2010) The COP9 signalosome mediates transcriptional and metabolic response to hormones, oxidative stress protection and cell wall rearrangement during fungal development. *Mol Microbiol* **78**: 964-979.
- Navarro,R.E., and Aguirre,J. (1998) Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bacteriol* **180**: 5733-5738.
- Navarro,R.E., Stringer,M.A., Hansberg,W., Timberlake,W.E., and Aguirre,J. (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* **29**: 352-359.
- Nayak,T., Szewczyk,E., Oakley,C.E., Osmani,A., Ukil,L., Murray,S.L. *et al.* (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Netzker,T., Fischer,J., Weber,J., Mattern,D.J., Konig,C.C., Valiante,V. *et al.* (2015) Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front Microbiol* **6**: 299.
- Nguyen,M., Ekstrom,A., Li,X., and Yin,Y. (2015) HGT-Finder: A New Tool for Horizontal Gene Transfer Finding and Application to *Aspergillus* genomes. *Toxins (Basel)* **7**: 4035-4053.
- Ni,M., and Yu,J.H. (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**: e970.
- Nielsen,M.L., Nielsen,J.B., Rank,C., Klejnstrup,M.L., Holm,D.K., Brogaard,K.H. *et al.* (2011) A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **321**: 157-166.
- Oh,D.C., Kauffman,C.A., Jensen,P.R., and Fenical,W. (2007) Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *J Nat Prod* **70**: 515-520.
- Oiartzabal-Arano,E., Garzia,A., Gorostidi,A., Ugalde,U., Espeso,E.A., and Etxebeste,O. (2015) Beyond asexual development: modifications in the gene expression profile caused by the absence of the *Aspergillus nidulans* transcription factor FlbB. *Genetics* **199**: 1127-1142.
- Oiartzabal-Arano,E., Perez-de-Nanclares-Arregi,E., Espeso,E.A., and Etxebeste,O. (2016) Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **62**: 371-377.
- Orlando,V., Strutt,H., and Paro,R. (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**: 205-214.
- Oshero,N., and May,G. (2000) Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* **155**: 647-656.
- Panayotis,N., Karpova,A., Kreutz,M.R., and Fainzilber,M. (2015) Macromolecular transport in synapse to nucleus communication. *Trends Neurosci* **38**: 108-116.
- Pantazopoulou,A., and Penalva,M.A. (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**: 4335-4347.

- Pantazopoulou,A., Pinar,M., Xiang,X., and Penalva,M.A. (2014) Maturation of late Golgi cisternae into RabE(RAB11) exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol Biol Cell* **25**: 2428-2443.
- Paoletti,M., Seymour,F.A., Alcocer,M.J., Kaur,N., Calvo,A.M., Archer,D.B., and Dyer,P.S. (2007) Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **17**: 1384-1389.
- Park,H.S., and Yu,J.H. (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**: 669-677.
- Penalva,M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963-975.
- Penalva,M.A. (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**: 684-692.
- Perez-de-Nanclares-Arregi,E., and Etxebeste,O. (2014) Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **70**: 33-41.
- Peter,I.S., and Davidson,E.H. (2011) Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development. *Cell* **144**: 970-985.
- Pontecorvo,G., Roper,J.A., Hemmons,L.M., Macdonald,K.D., and Bufton,A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.
- Prade,R.A., and Timberlake,W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* brlA regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**: 2439-2447.
- Purschwitz,J., Muller,S., Kastner,C., Schooser,M., Haas,H., Espeso,E.A. *et al.* (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**: 255-259.
- Riquelme,M. (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**: 587-609.
- Rodriguez-Romero,J., Franceschetti,M., Bueno,E., and Sesma,A. (2015) Multilayer regulatory mechanisms control cleavage factor I proteins in filamentous fungi. *Nucleic Acids Res* **43**: 179-195.
- Rodriguez-Romero,J., Hedtke,M., Kastner,C., Muller,S., and Fischer,R. (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**: 585-610.
- Rodriguez-Urra,A.B., Jimenez,C., Nieto,M.I., Rodriguez,J., Hayashi,H., and Ugalde,U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* **7**: 599-606.
- Roncal,T., Cordobes,S., Sterner,O., and Ugalde,U. (2002) Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryot Cell* **1**: 823-829.

- Roncal,T., and Ugalde,U. (2003) Conidiation induction in *Penicillium*. *Res Microbiol* **154**: 539-546.
- Rosen,S., Yu,J.H., and Adams,T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**: 5592-5600.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.
- Sasan,R.K., and Bidochka,M.J. (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am J Bot* **99**: 101-107.
- Scherlach,K., Schuemann,J., Dahse,H.M., and Hertweck,C. (2010) Aspernidine A and B, prenylated isoindolinone alkaloids from the model fungus *Aspergillus nidulans*. *J Antibiot (Tokyo)* **63**: 375-377.
- Schroeckh,V., Scherlach,K., Nutzmann,H.W., Shelest,E., Schmidt-Heck,W., Schuemann,J. *et al.* (2009) Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14558-14563.
- Schultzhaus,Z.S., and Shaw,B.D. (2015) Endocytosis and exocytosis in hyphal growth. *Fungal Biology Reviews* **29**: 43-53.
- Senger,K., Armstrong,G.W., Rowell,W.J., Kwan,J.M., Markstein,M., and Levine,M. (2004) Immunity regulatory DNAs share common organizational features in *Drosophila*. *Mol Cell* **13**: 19-32.
- Seo,J.A., Guan,Y., and Yu,J.H. (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544.
- Sewall,T.C., Mims,C.W., and Timberlake,W.E. (1990a) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**: 731-739.
- Sewall,T.C., Mims,C.W., and Timberlake,W.E. (1990b) Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev Biol* **138**: 499-508.
- Shendure,J. (2008) The beginning of the end for microarrays? *Nat Methods* **5**: 585-587.
- Sibthorp,C., Wu,H., Cowley,G., Wong,P.W., Palaima,P., Morozov,I.Y. *et al.* (2013) Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. *BMC Genomics* **14**: 847.
- Siggers,T., and Gordan,R. (2014) Protein-DNA binding: complexities and multi-protein codes. *Nucleic Acids Res* **42**: 2099-2111.
- Skromne,I., Sanchez,O., and Aguirre,J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141 (Pt 1)**: 21-28.
- Soid-Raggi,G., Sanchez,O., and Aguirre,J. (2006) *TmpA*, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **59**: 854-869.

Soid-Raggi,G., Sanchez,O., Ramos-Balderas,J.L., and Aguirre,J. (2016) The Adenylate-Forming Enzymes AfeA and TmpB Are Involved in *Aspergillus nidulans* Self-Communication during Asexual Development. *Front Microbiol* **7**: 353.

Son,H., Kim,M.G., Chae,S.K., and Lee,Y.W. (2014) FgFlbD regulates hyphal differentiation required for sexual and asexual reproduction in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *J Microbiol* **52**: 930-939.

Soufi,A., Garcia,M.F., Jaroszewicz,A., Osman,N., Pellegrini,M., and Zaret,K.S. (2015) Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* **161**: 555-568.

Spitz,F., and Furlong,E.E. (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* **13**: 613-626.

Steinberg,G. (2007) Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. *Trends Microbiol* **15**: 14-21.

Stinnett,S.M., Espeso,E.A., Cobeno,L., Araujo-Bazan,L., and Calvo,A.M. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**: 242-255.

Subramanyam,E., Mohandoss,S., and Shin,H.W. (2009) Synthesis, characterization, and evaluation of antifouling polymers of 4-acryloyloxybenzaldehyde with methyl methacrylate. *J Appl Polym Sci* **112**: 2741-2749.

Swanson,C.I., Evans,N.C., and Barolo,S. (2010) Structural rules and complex regulatory circuitry constrain expression of a Notch- and EGFR-regulated eye enhancer. *Dev Cell* **18**: 359-370.

Taheri-Talesh,N., Horio,T., Araujo-Bazan,L., Dou,X., Espeso,E.A., Penalva,M.A. *et al.* (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 1439-1449.

Tahirov,T.H., Sato,K., Ichikawa-Iwata,E., Sasaki,M., Inoue-Bungo,T., Shiina,M. *et al.* (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* **108**: 57-70.

Takeshita,N., Higashitsuji,Y., Konzack,S., and Fischer,R. (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 339-351.

Takeshita,N., Manck,R., Grun,N., de Vega,S.H., and Fischer,R. (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**: 34-41.

Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F., and Higgins,D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.

Thompson,K.R., Otis,K.O., Chen,D.Y., Zhao,Y., O'Dell,T.J., and Martin,K.C. (2004) Synapse to nucleus signaling during long-term synaptic plasticity; a role for the classical active nuclear import pathway. *Neuron* **44**: 997-1009.

Tilburn,J., Scazzocchio,C., Taylor,G.G., Zabicky-Zissman,J.H., Lockington,R.A., and Davies,R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.

- Toda,T., Shimanuki,M., Saka,Y., Yamano,H., Adachi,Y., Shirakawa,M. *et al.* (1992) Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Mol Cell Biol* **12**: 5474-5484.
- Todd,R.B., and Andrianopoulos,A. (1997) Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**: 388-405.
- Todd,R.B., Davis,M.A., and Hynes,M.J. (2007a) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2**: 822-830.
- Todd,R.B., Davis,M.A., and Hynes,M.J. (2007b) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* **2**: 811-821.
- Trapnell,C., Roberts,A., Goff,L., Pertea,G., Kim,D., Kelley,D.R. *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**: 562-578.
- Tsitsigiannis,D.I., and Keller,N.P. (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* **15**: 109-118.
- Tsitsigiannis,D.I., Kowieski,T.M., Zarnowski,R., and Keller,N.P. (2004) Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1398-1411.
- Tsitsigiannis,D.I., Kowieski,T.M., Zarnowski,R., and Keller,N.P. (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**: 1809-1821.
- Twumasi-Boateng,K., Yu,Y., Chen,D., Gravelat,F.N., Nierman,W.C., and Sheppard,D.C. (2009) Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **8**: 104-115.
- Ugalde,U. (2006) Autoregulatory signals in mycelial fungi. In *The Mycota I: Growth, differentiation and sexuality*. Kues,U., and Fischer,R. (eds). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 203-211.
- Ugalde,U., and Rodriguez-Urra,A.B. (2014) The Mycelium Blueprint: insights into the cues that shape the filamentous fungal colony. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8809-8819.
- Vallim,M.A., Miller,K.Y., and Miller,B.L. (2000) *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn+2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**: 290-301.
- Vargas-Perez,I., Sanchez,O., Kawasaki,L., Georgellis,D., and Aguirre,J. (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **6**: 1570-1583.
- Virginia,M., Appleyard,C.L., McPheat,W.L., and Stark,M.J. (2000) A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **37**: 364-372.

von Dohren H. (2009) A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S45-S52.

Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M. *et al.* (2010) Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **38**: 5075-5087.

Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57-63.

Wieser, J., and Adams, T.H. (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**: 491-502.

Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J., III, and Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62-69.

Wortman, J.R., Gilsenan, J.M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R. *et al.* (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S2-13.

Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., and Zhang, J. (2015) Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cell Mol Life Sci* **72**: 3267-3280.

Yaegashi, J., Praseuth, M.B., Tyan, S.W., Sanchez, J.F., Entwistle, R., Chiang, Y.M. *et al.* (2013) Molecular genetic characterization of the biosynthesis cluster of a prenylated isoindolinone alkaloid aspernidine A in *Aspergillus nidulans*. *Org Lett* **15**: 2862-2865.

Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P. *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359-1362.

Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H.R., Chandra, G., Chater, K.F., Dover, L.G. *et al.* (2010) Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. *J Bacteriol* **192**: 841-860.

Yu, H., and Gerstein, M. (2006) Genomic analysis of the hierarchical structure of regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14724-14731.

Yu, J., Fedorova, N.D., Montalbano, B.G., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., and Nierman, W.C. (2011) Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS Microbiol Lett* **322**: 145-149.

Yu, J.H. (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **44**: 145-154.

Yu, J.H., Mah, J.H., and Seo, J.A. (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot Cell* **5**: 1577-1584.

Zaehle, C., Gressler, M., Shelest, E., Geib, E., Hertweck, C., and Brock, M. (2014) Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. *Chem Biol* **21**: 719-731.

Zaret, K.S., and Carroll, J.S. (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**: 2227-2241.

Zekert, N., and Fischer, R. (2009) The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell* **20**: 673-684.

Zerial, M., and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 107-117.

Anexos.

ANEXO 1. RNA-seq. Análisis de la reproducibilidad de las muestras.

El RNA-seq realiza un análisis cuantitativo del transcriptoma y en el caso de esta tesis doctoral, dos fueron las réplicas biológicas realizadas por cepa ($\Delta flbB$ y WT) y condición (VG y AD). Debido al uso de duplicados, se comprobó la homogeneidad y reproducibilidad de las muestras antes de empezar a examinar los resultados de secuenciación. Para analizar la homogeneidad se examinó la gráfica de densidad, donde se representa la densidad de genes respecto a los valores FPKM (Figura 7.1A). Concretamente, la atención se centró en comprobar que la distribución de la densidad de los genes respecto a los valores FPKM fuese uniforme en las cuatro muestras, tal y como se puede observar en la Figura 7.1A. Ello permite concluir que las muestras formaban un grupo homogéneo de transcriptomas.

El parámetro FPKM indica el valor cuantitativo y normalizado de las lecturas de cada gen, es decir, es el parámetro clave que representa el nivel de expresión de cada gen en cada fase de desarrollo. Por eso, fue también empleado para el estudio de la reproducibilidad en las réplicas biológicas. Cada punto de cada gráfica en la Figura 7.1B muestra los dos valores \log_{10} (FPKM + 1) para un gen determinado en cada réplica biológica (ejes X e Y), por cepa y condición. En todos los casos, la correlación fue igual o superior a 0.9 ($r_{VG} = 0.98$ y $r_{AD} = 0.92$ para la cepa silvestre y $r_{VG} = 0.90$ y $r_{AD} = 0.99$ para la cepa nula en *flbB*). Las directrices generales establecidas por el proyecto ENCODE (<https://www.encodeproject.org>) respecto a los duplicados biológicos validaron las muestras analizadas al presentar estas correlaciones iguales o superiores a 0.90.

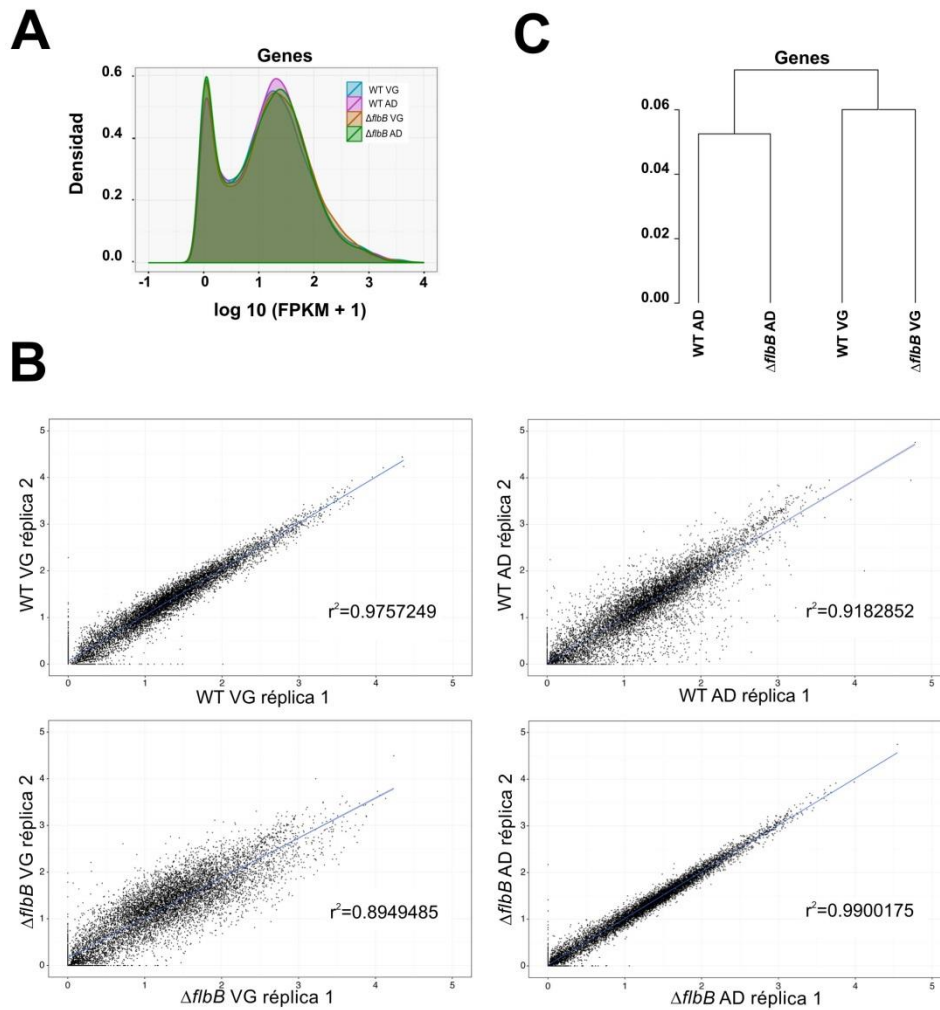


Figura 7.1. Validación de los resultados de secuenciación. A) Gráfica de densidad que representa la densidad de los genes respecto a los valores FPKM para las cuatro muestras analizadas. B) Análisis de la reproducibilidad de los replicados biológicos. Los gráficos superiores representan las muestras correspondientes a la cepa silvestre (VG, izquierda, y AD, derecha) y las gráficas inferiores son para las muestras de la cepa *ΔflbB*. Los ejes X e Y representan los valores log₁₀ (FPKM + 1) de cada replicado. C) Dendrograma con el emparejamiento de las secuenciaciones correspondientes a las muestras de las fases VG, por un lado, y AD, por el otro.

Finalmente, el dendrograma en la Figura 7.1C, el cual asocia secuencias por sus semejanzas, emparejó las secuencias de las fases VG y AD por separado. Por lo tanto, se podría deducir que la ausencia de *flbB* no cambia de forma significativa el perfil de expresión como para perder las características y similitudes esenciales de cada fase de desarrollo, no sólo en VG sino también en la fase AD.

ANEXO 2:

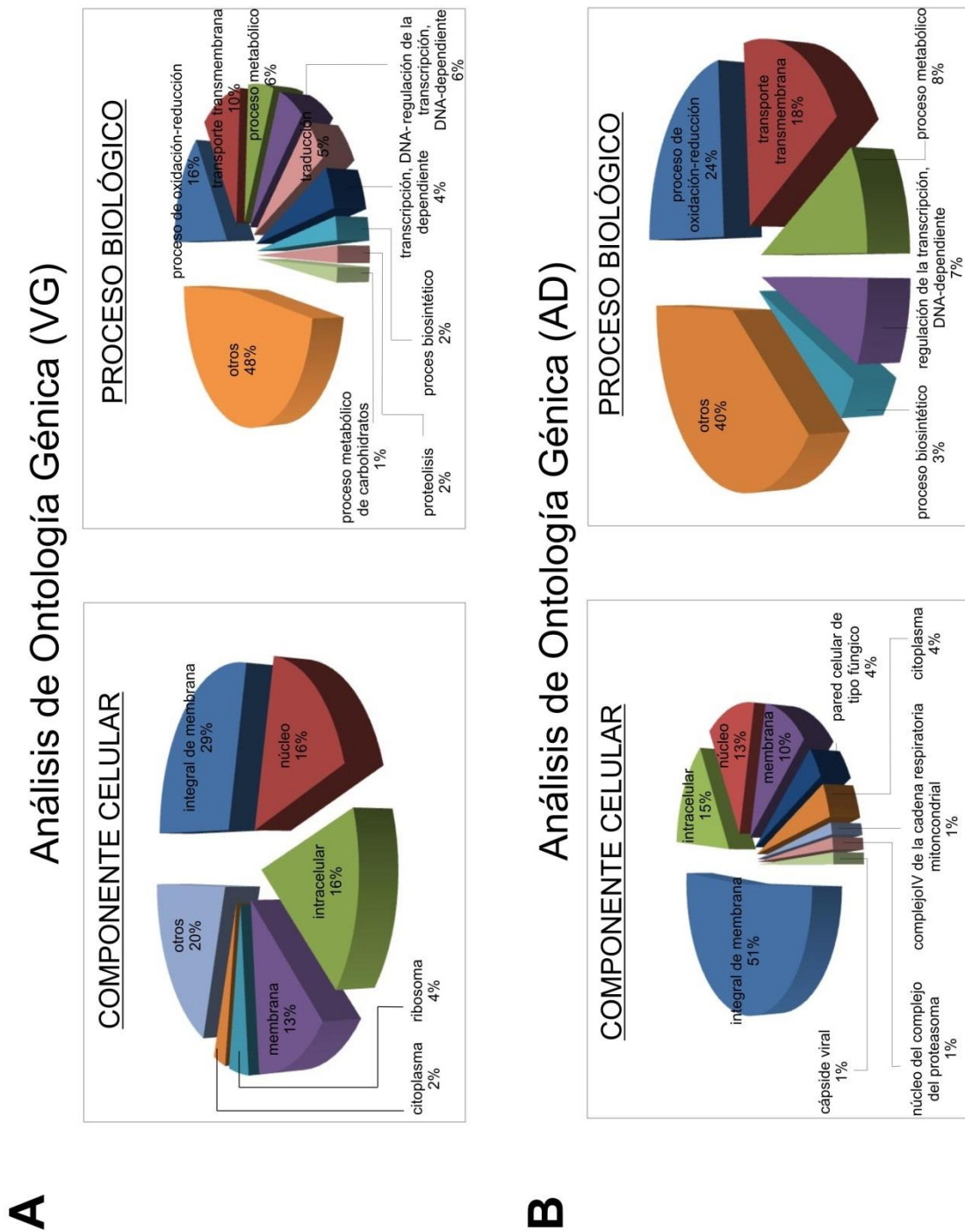


Figura 7.2. Términos GO asignados a los genes previamente no caracterizados y diferencialmente expresados en las comparaciones correspondientes a las fases VG (A) y AD (B), respectivamente.

ANEXO 3:

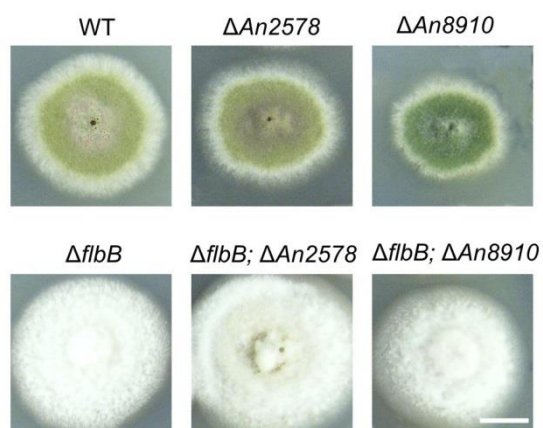


Figura 7.3. Fenotipo de las cepas $\Delta An2578$ y $\Delta An8910$ en comparación con los parentales silvestre y $\Delta flbB$. Las imágenes fueron tomadas tras 48 horas de cultivo a 37°C en MMA. Barra de escala = 1 cm.

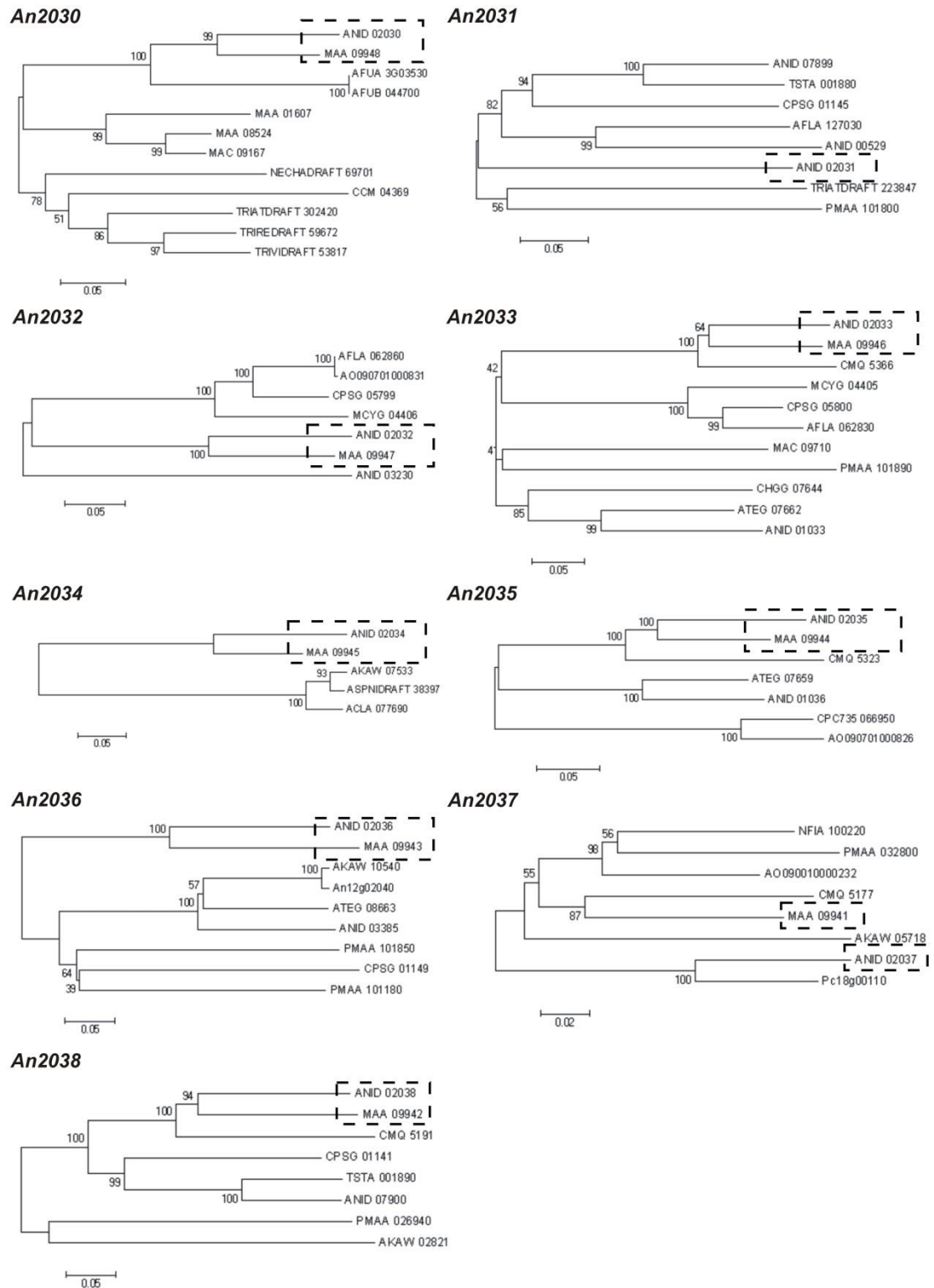
ANEXO 4:

Figura 7.4. Análisis filogenéticos (software MEGA) para cada uno de los genes del *cluster* An2030-2038.

ANEXO 5:

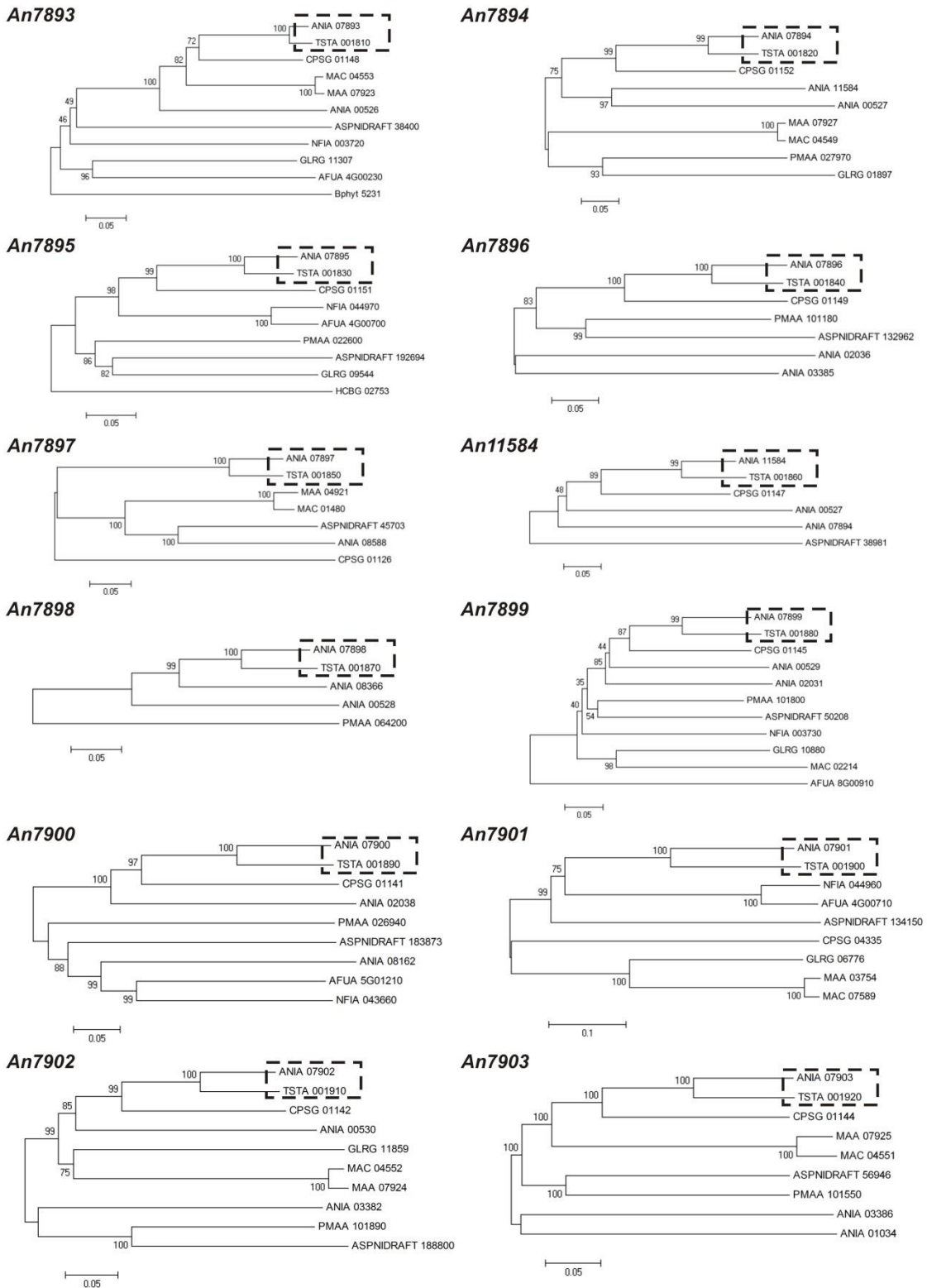


Figura 7.5. Análisis filogenéticos (software MEGA) para cada uno de los genes del *cluster dba*.

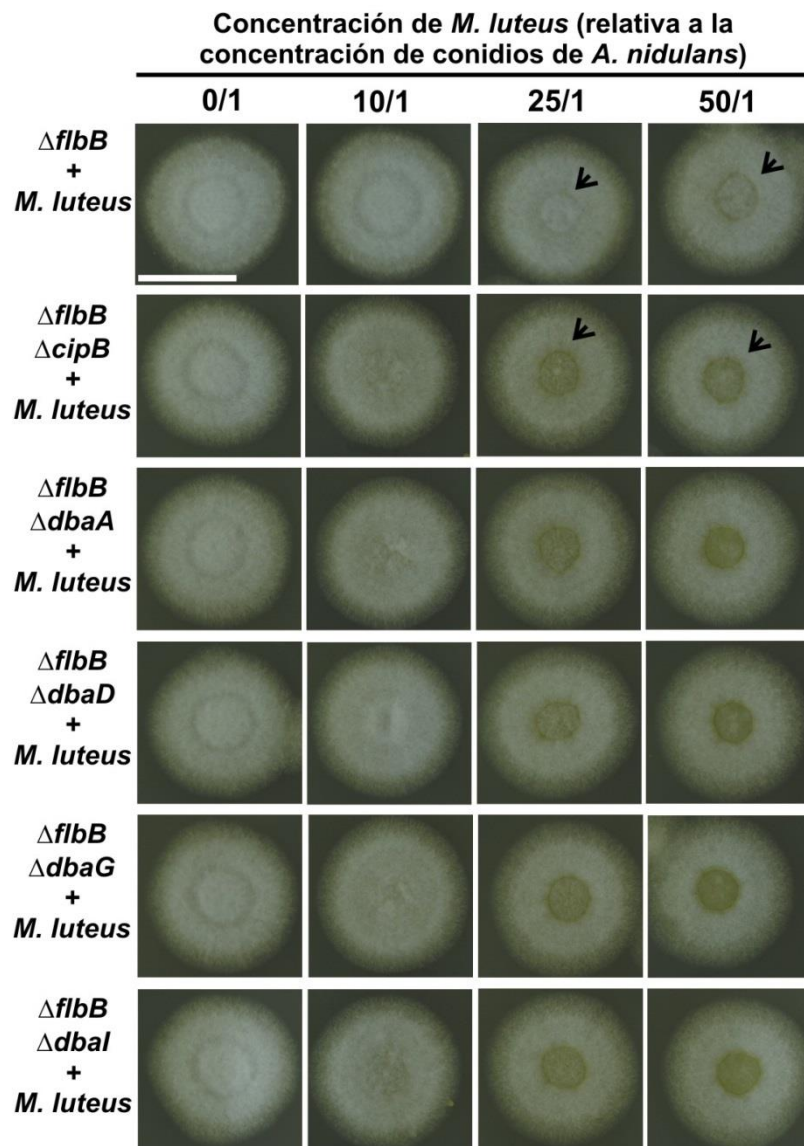
ANEXO 6:

Figura 7.6. Comparación fenotípica entre la cepa $\Delta flbB$ (línea 1; control) y dobles nulos de *flbB* y genes *dba*, después de 48 h cultivo junto con concentraciones crecientes de *M. luteus* en un medio LB apropiadamente suplementado. Las puntas de flecha negras indican la región de co-cultivo. Las relaciones entre las concentraciones de células bacterianas y conidios están indicadas en cada columna. Barra de escala, 2 cm.

ANEXO 7:

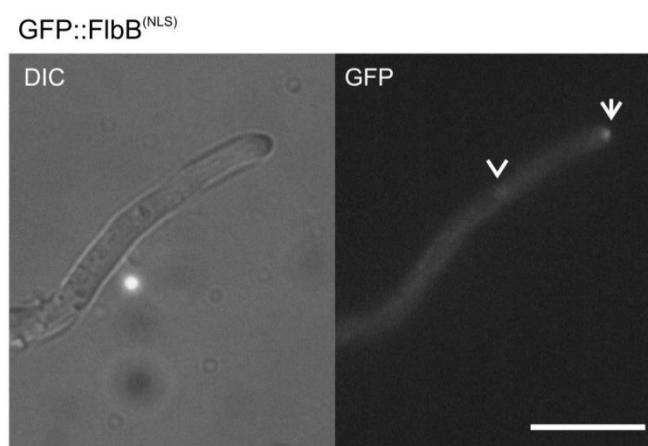


Figura 7.7. Localización subcelular de la quimera mutante GFP::FibB^(NLS*). Barra de escala = 10 μ m.

ANEXO 8:

Beyond Asexual Development: Modifications in the Gene Expression Profile Caused by the Absence of the *Aspergillus nidulans* Transcription Factor FlbB

Elixabet Oartzabal-Arano,^{*1} Aitor Garzia,^{*1} Ana Gorostidi,[†] Unai Ugalde,^{*} Eduardo A. Espeso,[‡] and Oier Etxebeste^{*2}

^{*}Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, Manuel de Lardizabal, 3, 20018, San Sebastian, Spain, [†]Biodonostia Research Institute, Genomic Platform, Doctor Begiristain, s/n, 20014, San Sebastian, Spain, [‡]Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, Spain

ABSTRACT In the model fungus *Aspergillus nidulans*, asexual development is induced from vegetative hyphae by a set of early regulators including the bZIP-type transcription factor FlbB. To determine the range of genes under the influence of the transcriptional activity of FlbB and to characterize their role in fungal development, we sequenced and compared the transcriptomes of a $\Delta flbB$ mutant and its isogenic wild-type strain at different developmental stages. Results confirmed the activating role of FlbB on downstream regulators of conidiation such as *flbD* and *brlA*. However, FlbB has additional functions beyond the induction of asexual development. Among the changes observed, absence of a functional FlbB caused induction of the *dba* cluster and synthesis of a secondary metabolite with bactericidal properties. In addition, a new transcriptional target of FlbB was unveiled, *urdA*, that codes for a putative transcription factor that represses premature sexual development. Taken together, our results indicate that the activators of asexual development simultaneously exert a role on other cellular functions, including an inhibitory effect on the sexual cycle, and reinforce the hypothesis that mutually exclusive metabolic and cellular patterns are associated with different morphogenetic programs.

KEYWORDS *Aspergillus nidulans*; mRNA sequencing; transcriptional regulation; development; secondary metabolite cluster

CELLULAR morphogenesis can be defined as programmed gene expression changes that lead to the development of specialized cell types. Basic eukaryotic morphogenetic mechanisms are commonly studied using fungi as models. *Aspergillus nidulans* is a nonpathogenic fungus that is phylogenetically related to clinically important species (*A. fumigatus*) as well as species with economical or industrial value such as *A. niger* and *A. oryzae*. In addition, *A. nidulans* is the main reference organism in basic studies of asexual development (Etxebeste *et al.* 2010a; Park and Yu 2012). The production of asexual spores (conidia) is induced in nonspecialized cells called *vegetative hyphae* and

involves the biogenesis of a succession of cell types that results in the generation of structures called *conidiophores* (Mims *et al.* 1988).

A significant number of genes involved in asexual development have been identified and characterized (Etxebeste *et al.* 2010a; Ni *et al.* 2010; Park and Yu 2012). Some of them are specific to the morphogenetic process and control the later stages leading to conidia production. *brlA*, the first development-specific transcription factor; *abaA*; and *wetA* constitute the backbone of the central developmental pathway (CDP) and regulate the expression of genes involved in the correct spatiotemporal formation of the conidiophore cell types (Park and Yu 2012).

The specialization of vegetative hyphae into asexual reproductive structures is induced by exogenous and endogenous stimuli (Fischer and Kües 2006). This requires the existence of an efficient genetic mechanism to guarantee that these cues are correctly transduced into signals that activate the CDP. This role is played by upstream developmental activators (UDAs) (Wieser *et al.* 1994; Etxebeste *et al.* 2010a),

Copyright © 2015 by the Genetics Society of America
doi: 10.1534/genetics.115.174342

Manuscript received January 9, 2015; accepted for publication February 15, 2015;
published Early Online February 20, 2015.

Supporting information is available online at <http://www.genetics.org/lookup/suppl/doi:10.1534/genetics.115.174342/-/DC1>

¹These authors contributed equally to this work.

²Corresponding author: Manuel de Lardizabal, 3, 20018, San Sebastian, Spain.

E-mail: oier.echebeste@ehu.es

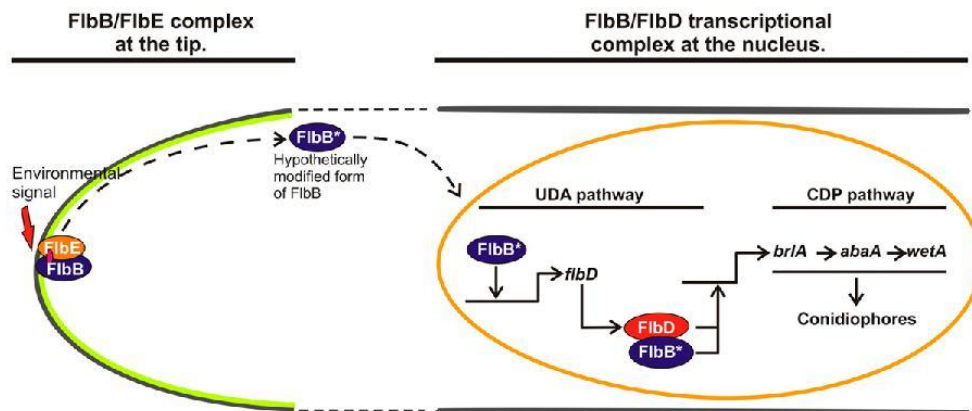


Figure 1 Model for the induction of conidiophore development through FlbB. The bZIP transcription factor is retained at the tip of vegetative hyphae through the interaction with FlbE (left). The complex may play a sensor role in the reception of inducing environmental signals, which would provoke a modification of FlbB sequence (FlbB*) and its transport to the nucleus (right). There FlbB activates the expression of *flbD*, and then both factors jointly induce the expression of *brlA*, the first conidiation-specific transcription factor. Updated from Etxebeste *et al.* (2010a).

a set of proteins that launch the initial morphogenetic transformations leading to vesicle formation. Loss-of-function mutations in UDA genes yield the “fluffy” phenotype, characterized by the absence of *brlA* activation and thus cell differentiation (Wieser *et al.* 1994).

A key UDA factor in the activation of *brlA* is FlbB, the first transcription factor in *A. nidulans* detected at the tip of vegetative hyphae (Etxebeste *et al.* 2010a). Apical FlbB is thought to act as a sensor mechanism involved in the transduction of environmental signals to nuclei (Figure 1). Nuclear FlbB first induces the expression of the cMyb-type UDA transcription factor-coding gene *flbD*, and then both factors jointly bind *brlA* promoter to trigger conidiophore development.

To gain a better understanding of FlbB activity and identify new transcriptional targets, we sequenced the transcriptomes of a $\Delta flbB$ mutant and its isogenic wild-type (WT) strain at specific stages of the *A. nidulans* life cycle. Results indicate that FlbB has an important role not only in the induction of the asexual process but also in the repression of a premature induction of sexual development. The inability to induce asexual development caused by the absence of FlbB also results in an important variation in the expression of secondary metabolite clusters and the production of antibacterial metabolites.

Materials and Methods

Fungal strains and culture conditions

We used for the RNA-seq experiment *A. nidulans* strain BD143 (Etxebeste *et al.* 2008) as an *flbB* null mutant and strain MAD2666, which was provided by Dr. A. Markina-Iñarrairaegui, as the isogenic WT reference (Garzia *et al.* 2013). Vegetative cell samples and those from the asexual stage were obtained as described previously (Garzia *et al.* 2013). Two biological replicates were processed for each culture condition and strain.

Genomic cassettes for the generation of *urda*, *dba*-cluster or *An2030/2038*-cluster mutants were amplified through the fusion-PCR technique (Yang *et al.* 2004). The oligonucleotides and strains used are shown in supporting information, File S1, Table S1 and Table S2, respectively. Transformation of *A. nidulans* protoplasts followed the protocol described by Tilburn *et al.* (1983). The revertant strain for the null *urda* mutant was generated by transforming protoplasts of this strain with a genomic cassette bearing the *urda* ORF plus its promoter and the 3'-UTR region. The selection of transformants was done using 5-fluoroorotic acid (FOA; 2 mg/ml; Apollo Scientific, Cheshire, UK), and the homologous recombination of the construct at the *urda* locus was confirmed by Southern blot. Northern and Southern blot experiments (oligonucleotides for probe generation are shown in Table S1) were done as described previously (Garzia *et al.* 2009). *Aspergillus* minimal medium (MMA) was prepared as described by Kafer (1965). Saline or osmotic stress conditions were induced by adding sodium dihydrogen phosphate (0.5 M), sucrose (1 M), sorbitol (1.2 M), or NaCl (0.8 M) to MMA. Cycloheximide (20 μ g/ml) was used as an inhibitor of mRNA translation.

Quantitative counts of conidia (in conidia/cm²) were obtained after culturing strains in MMA at 37° for 72 hr. Colony diameters were measured and spores collected and quantified using a hemocytometer. Cleistothecia counts were obtained after culturing strains in MMA for 156 hr. The protocol described by Baidya *et al.* (2011) was followed. Briefly, cores (8 mm in diameter) were collected from each plate, and ethanol (70%) was sprayed onto the core surface to facilitate visualization of cleistothecia under the microscope. Results provided are the mean values of three replicates per strain and condition with the standard error of the mean (SEM).

Cocultures of *A. nidulans* and *Micrococcus luteus* were prepared starting from solutions containing 10^7 *A. nidulans* conidia or 10^8 bacterial cells per milliliter. Briefly, fungal conidia and bacterial cells were independently cultured at 200 rpm for 4 hr at 37° or 1 hr at 30°, respectively. Fungal conidia were diluted in Eppendorf tubes to 10^6 per milliliter, and increasing concentrations of bacterial cells were added to each tube (0, 10^7 , 2.5×10^7 , and 5.0×10^7 cells/ml, respectively). Control tubes containing only bacterial cells were prepared using the same set of concentrations. Then 10 μ l of each mixture (2.0×10^4 conidia) was point inoculated on Luria-Bertani (LB) plates adequately supplemented to support growth of the fungal strains assayed. Photographs were acquired after 48 hr of culture. At this time point, 0.60-cm plugs from the cultures were excised. Cells were resuspended in 2.5 ml of LB medium by vortexing for 30 sec. Bacterial cells were counted using a hemocytometer. All results are the mean and SEM of three biological and nine technical replicates per strain.

RNA isolation, mRNA library construction, and Illumina sequencing

Total RNA extraction from cell samples was performed according to the Invitrogen protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA) based on TRIzol reagent (Garzia *et al.* 2013). An RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) was used for RNA sample purification. The concentration and integrity of total RNA were checked using a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

mRNA libraries were prepared from *A. nidulans* total RNA samples following Illumina standard protocols (Illumina, San Diego, CA). Briefly, each total RNA sample (20–50 μ g) was treated with DNase and enriched for mRNA using oligo(dT) tags. Samples of poly(A) RNA (0.2–1 μ g) were fragmented into smaller pieces (200–500 bp; mean for all libraries is approximately 280 bp) and used to synthesize cDNA. The cDNA library construction involved end repair, A-tailing, adapter ligation, and library amplification followed by cluster generation and sequencing. Sequencing was performed in a pair-end-read, 2×76 -base mode on a GAIIx Sequencer (Illumina) running four samples per lane (multiplexing).

Demultiplexing, mapping, assembling, and quantifying sequencing data

Sequences were demultiplexed with demultiplexing software by Brian J. Knaus (<http://brianknaus.com/>). Reads with quality values higher than Q30 in the fastQC program were introduced for mapping. They were mapped using Bowtie 2.0.0-beta5 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) using parameters by default. The *Aspergillus* Genome Database (AspGD; <http://www.aspergillusgenome.org/>) provided version s07-m02-r07 of the annotated genome of *A. nidulans*, which was used as the template for mapping.

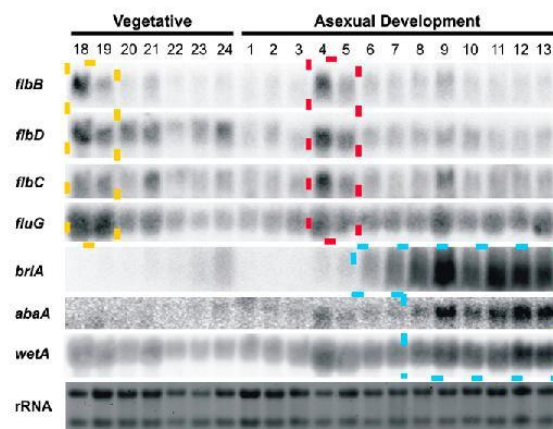


Figure 2 Northern blot analysis showing the hourly expression of selected UDA genes (*flbB*, *flbD*, *flbC*, and *fluG*) and CDP genes (*briA*, *abaA*, and *wetA*), both during vegetative growth (18–24 hr) and asexual development (1–13 hr after the induction). The orange rectangles demark time points with the maximum UDA expression. The red rectangles demark the expression peak for UDAs during conidiophore development. The blue rectangles demark the increase in the accumulation of CDP transcripts. rRNAs are shown as loading control.

Gene expression analysis

Open-source software such as TopHat and Cuffdiff were used for the mathematical analysis and comprehensive expression analysis of high-throughput RNA sequencing data. To associate with predicted genes, the reference for the gtf file generated in previous mapping steps was provided in a FASTA format by the AspGD. TopHat version 2.0.9 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) provided the preformatted mapping files that were used as input files. The steps described followed the protocol by Trapnell and colleagues (Trapnell *et al.* 2012; Garzia *et al.* 2013).

Cufflinks version 2.1.1 was used for transcript assembly, estimation of transcript abundance, and testing of differential expression. The significance in the expression difference of a specific gene in two genetic backgrounds was determined, which calculates the *P*-value (the uncorrected *P*-value of the test statistic) and the *Q*-value [the false-discovery-rate (FDR)–adjusted *P*-value of the test statistic]. An expression difference will be significant if *P* is greater than the FDR after Benjamini-Hochberg correction (Benjamini *et al.* 2001) for multiple testing (in our case, *Q*-values between 0 and 0.05 indicate significant changes). Data were analyzed in the R statistical language based on CummeRbund and pheatmap packages.

Gene ontology analysis

Gene ontology terms for each *A. nidulans* gene were obtained from the AspGD (http://www.aspgd.org/download/go/gene_association.aspgd.gz) and were related with terms downloaded in OBO from the Gene Ontology (GO) project (http://www.geneontology.org/ontology/obo_format_1_2/gene_ontology_ext.obo). The GO project provided a standardized set of terms describing the molecular function of genes. We used

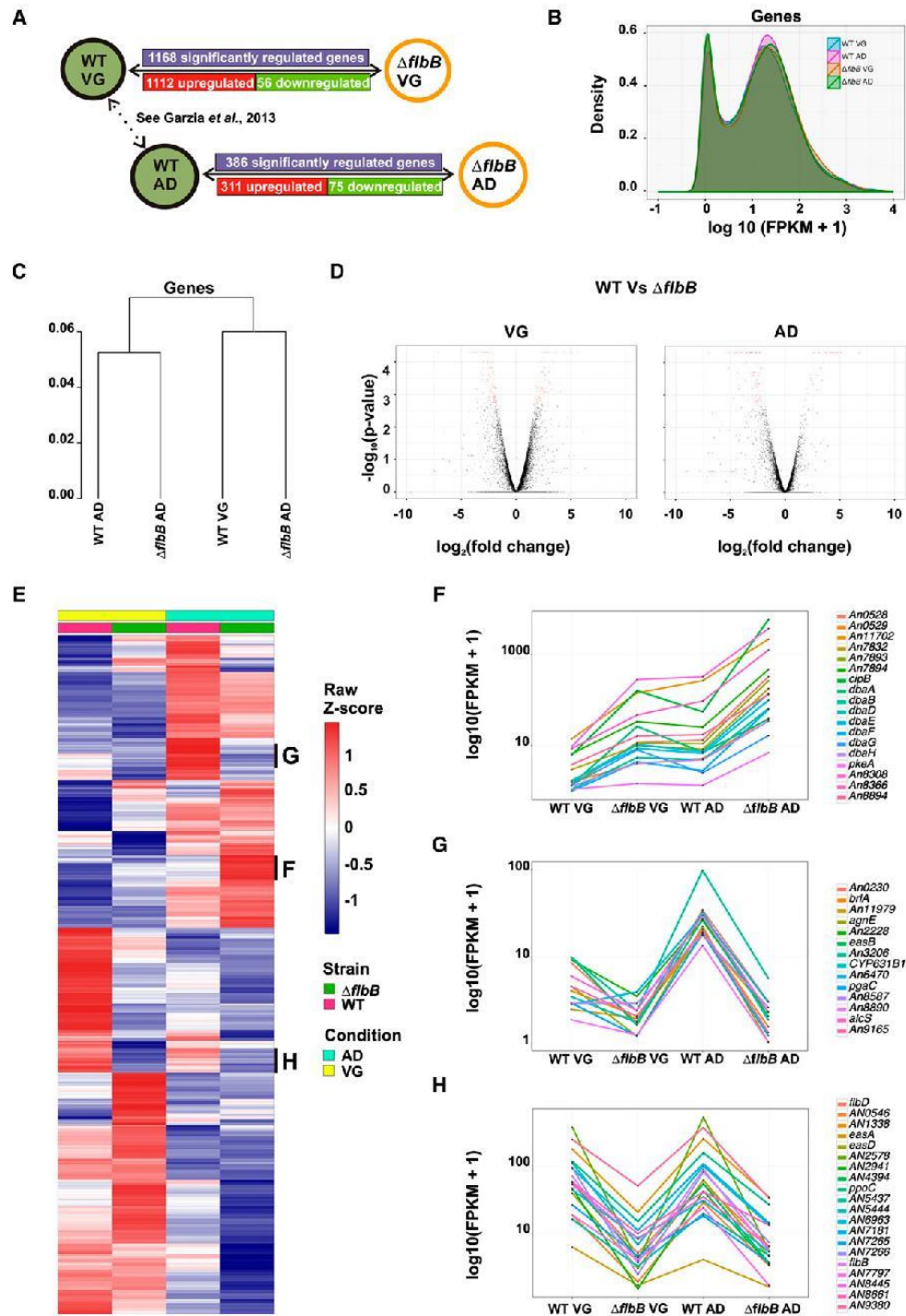


Figure 3 Experimental approach and clustering of significantly deregulated genes. (A) Experimental design and general transcriptomic results. Strains ($\Delta flbB$ and an isogenic WT strain) and time points selected [19 hr of vegetative growth (VG) and 5 hr of asexual development (AD)] are indicated. Black

the topGO package from the Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>) to identify overrepresented GO terms from a set of differentially expressed genes. Python (<http://www.python.org/>) was used to prepare the data using rpy2 (<http://rpy.sourceforge.net/rpy2.html>) to call R for the statistical analysis.

Nucleotide sequence accession number

Sequence reads were submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) and deposited under Accession Numbers SRX206691 for WT (Garzia *et al.* 2013) and SRX286239 for $\Delta flbB$ strains.

Quantitative PCR (qPCR)

Total RNA samples from three independent biological replicates were treated with RNase-free DNase I and purified with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). First-strand cDNA was synthesized using the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) under the manufacturer's instructions. Each cDNA sample was tested in triplicate and included a control lacking reverse transcriptase.

Specific probes were designed and employed in qPCR assays (IDT primers and ZEN double-quenched probes; <http://eu.idtdna.com/site>) (Table S1). These probes were designed taking into consideration the sequences obtained from the RNA-seq experiment, which coincided with those obtained in a second, independent cDNA sequencing of *An7895*, *An7896*, and *An7901* (Table S1). qPCR assays were performed in an ABI 7900 HT system (Applied Biosystems, Foster, CA) by adding 5 μ l of 2 \times Brilliant II QPCR Master Mix (Agilent Technologies) to each well containing 20 ng of the template cDNA, 500 nM of forward and reverse primers, and 250 nM of the probe (total reaction volume of 10 μ l). Thermal cycling conditions were set as follows: an initial step at 95 $^{\circ}$ for 2 min and 40 cycles of 20 sec at 95 $^{\circ}$ and 1 min at 60 $^{\circ}$. We included control reactions without template [no template controls (NTCs)]. Transcript levels were expressed in ΔCt values, which represent $Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$, the difference in the Ct of the target gene compared with reference genes (*actA*; *mipA*).

Results

flbB deletion results in a broad transcriptional down-regulation

To determine the appropriate time point to compare WT and $\Delta flbB$ transcriptomes, we performed Northern blot analyses

of the expression of selected UDA genes (*flbB*, *flbD*, *flbC*, and *fluG*) and CDP genes (*brlA*, *abaA*, and *wetA*) all during vegetative growth (18–24 hr in Figure 2) and asexual development (1–13 hr after induction). UDAs were most clearly expressed after 18–19 hr of vegetative growth (orange rectangles in Figure 2) and 4–5 hr after induction of conidiation (red rectangles). The UDA expression peak observed at early asexual development preceded the induction of CDP genes (blue rectangles in Figure 2). Taking these results into consideration, we performed two RNA-seq analyses separately (Figure 3A). The first one analyzed vegetative hyphae grown for 19 hr in supplemented liquid medium (the acronym VG will be used), whereas the second one compared the transcriptomes after filtering vegetative mycelia and culturing them for 5 hr in an aerial environment (early stages of asexual development; acronym AD). This meant that the AD stage compared a strain developed asexually for 5 hr (WT) with a second strain ($\Delta flbB$) that was incapable of initiating asexual development.

Two biological replicates were analyzed per strain (an *flbB* null and its isogenic WT strain) and condition (VG and AD). The density plot in Figure 3B shows a homogeneous distribution of gene density in the genome across all samples, whereas the dendrogram in Figure 3C shows paired VG and AD samples separately. The correlation values obtained ($r_{\text{VG}} = 0.90$ and $r_{\text{AD}} = 0.99$ for the $\Delta flbB$ mutant and $r_{\text{VG}} = 0.98$ and $r_{\text{AD}} = 0.92$ for the WT strain) (Figure S1) followed the general guidelines for biological duplicates (correlation must be equal to or higher than 0.90; <https://www.encodeproject.org/>) and thus validated our experimental approach.

Reads obtained for VG and AD conditions, corresponding to both WT and $\Delta flbB$ genetic backgrounds, mapped for 9564 and 9812 genes, respectively, representing 87.4 and 89.7% of a total of 10,943 genes predicted by the AspGD (File S1). Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) values for all predicted *A. nidulans* genes in each strain and condition are shown in Table S3 (VG) and Table S4 (AD).

At VG, 1112 genes were up-regulated with FlbB activity (higher transcript levels in a WT strain than in a $\Delta flbB$ strain; $\log_2 FC > 0$), while only 56 were down-regulated ($\log_2 FC < 0$) (Figure 3A and red color in Figure 3D, Table S5). In contrast, AD samples showed 311 genes up-regulated and 75 down-regulated when FlbB was present (Figure 3, A and D, Table S6). Only 139 genes coincided in showing significant differences in expression in both conditions (listed in Figure S2;

arrows indicate the two transcriptional comparisons analyzed in this work. Dotted arrow indicates a previous transcriptional comparison described by Garzia *et al.* (2013). Purple indicates significantly deregulated genes, red is for FlbB up-regulated genes, and green is for FlbB down-regulated genes. (B) Density plot for the distribution of FPKM values for all genes across the four samples analyzed. (C) Dendrogram pairing VG and AD samples separately. (D) Volcano graphs representing transcriptional comparisons between $\Delta flbB$ and its isogenic WT strain at VG (left) and at AD (right), respectively. Genes (spots) with significant expression change are in red, and those with a nonsignificant expression change are in black. $\log_2 FC > 0$ values correspond to up-regulated genes, while $\log_2 FC < 0$ values correspond to down-regulated genes. (E) Heat-map illustration of a one-way hierarchical clustering analysis of differential expression based on a *t*-test and Benjamini-Hochberg correction and ranked by Z-score of the \log_2 RPKM, indicating genes that exhibited the most statistically significant changes in gene expression over the course of the experiment (205 genes in total). Several clusters of genes with similar expression profiles (EPs) were observed. Three of these EPs are indicated as F, G, and H and are presented in the corresponding panels, which show \log_{10} (FPKM + 1) values in each strain and condition for genes from each EP.

Table 1 Up-regulated and down-regulated top 20 genes in VG and AD stages

Rank	Gene	Value of $\Delta flbB$ VG	Value of WT VG	Log ₂ FC	Description
Up-regulated					
1	AN2578	3.37	1307.97	8.60	Predicted peroxidase activity
2	AN8910	0.06	19.98	8.30	Putative polyketide synthase (PKS)
3	<i>trxB</i>	0.92	147.25	7.32	Putative thioredoxin reductase
4	AN2941	0.95	115.28	6.93	Unknown
5	AN7266	2.28	204.04	6.49	Unknown
6	AN0546	0.36	32.10	6.48	Unknown
7	AN11210	0.50	43.85	6.45	Unknown
8	AN10473	0.16	13.52	6.44	Unknown
9	AN10505	0.10	8.57	6.42	Putative unsaturated rhamnogalacturonan hydrolase
10	AN11990	0.76	63.25	6.37	Unknown
11	AN5664	0.47	35.93	6.26	Unknown
12	<i>flbB</i>	2.12	153.27	6.18	Transcription factor involved in regulation of conidiophore development
13	AN3557	0.98	62.70	6.00	Unknown
14	<i>agnE</i>	0.20	11.68	5.90	Putative α -1,3-glucanase
15	AN3228	0.12	6.93	5.87	Predicted prenyltransferase
16	AN11215	1.53	71.75	5.55	Predicted metal ion transmembrane transporter activity
17	AN2352	0.48	22.58	5.55	Unknown
18	AN8445	3.08	127.78	5.37	Putative aminopeptidase Y
19	AN11313	3.53	141.02	5.32	Unknown
20	AN4394	3.82	143.46	5.23	Putative positive regulation of asexual sporulation
Down-regulated					
1	AN2034	187.30	3.12	-5.91	Unknown
2	AN7898	18.23	0.31	-5.87	Predicted role in transmembrane transport
3	<i>gelD</i>	501.96	9.38	-5.74	Putative 1,3- β -transglycosidase
4	AN8308	530.99	12.35	-5.43	Unknown
5	AN2035	6.09	0.15	-5.33	Putative polyketide synthase
6	<i>cipB</i>	323.65	8.23	-5.30	Putative oxidoreductase
7	AN2032	10.68	0.40	-4.73	Putative polyketide synthase
8	AN2031	48.36	2.00	-4.60	α/β -Hydrolase
9	AN2033	66.93	3.66	-4.19	Predicted monooxygenase activity
10	AN2038	71.01	3.90	-4.19	Predicted oxidoreductase activity
11	AN2030	244.00	13.74	-4.15	Predicted oxidoreductase
12	AN2036	27.90	1.63	-4.09	Putative transcription factor; predicted role in secondary metabolism
13	AN7896	44.34	2.76	-4.01	Transcription factor with a role in secondary metabolism
14	AN2037	558.34	41.44	-3.75	Predicted NAD binding oxidoreductase
15	AN8099	70.91	6.03	-3.56	Putative oxalate decarboxylase
16	AN7796	116.56	13.19	-3.14	Predicted role in transmembrane transport
17	AN11702	268.14	30.67	-3.13	Unknown
18	AN7901	15.78	1.94	-3.02	Putative fungal transcription factor
19	<i>furE</i>	514.57	64.50	-3.00	Protein with homology to the <i>S. cerevisiae</i> uracil transporter Fur4p
20	AN6782	15.10	1.91	-2.99	Predicted sodium:dicarboxylate symporter activity

Rank	Gene	Value of $\Delta flbB$ AD	Value of WT AD	Log ₂ FC	Description
Up-regulated					
1	AN6401	1.97	929.35	8.89	Putative hydrophobin
2	<i>agnE</i>	0.12	32.10	8.08	Putative alpha-1,3-glucanase
3	AN1941	1.60	398.07	7.96	Predicted glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein
4	AN3227	0.11	24.18	7.80	Predicted monooxygenase activity
5	AN5370	0.11	21.79	7.69	Predicted role in transmembrane transport
6	<i>ivoB</i>	1.07	214.46	7.64	Conidiophore-specific phenol oxidase
7	<i>abnC</i>	0.30	45.06	7.22	Protein with arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase activity
8	AN0587	0.10	12.16	6.92	Putative Hsp70 family chaperone
9	AN8890	0.14	16.95	6.90	Predicted carbohydrate binding and catalytic activity
10	AN2578	8.19	804.59	6.62	Predicted peroxidase activity

(continued)

Table 1, continued

Rank	Gene	Value of $\Delta flbB$ VG	Value of WT VG	$\log_2 FC$	Description
11	<i>rodA</i>	0.95	93.00	6.62	Hydrophobin involved in conidium development
12	<i>easC</i>	0.46	45.18	6.61	Putative acyltransferase required for emericellamide biosynthesis
13	<i>AN8774</i>	0.11	9.16	6.41	Unknown
14	<i>brlA</i>	0.31	25.22	6.36	Transcription factor regulator of conidiophore development
15	<i>AN3247</i>	0.26	20.83	6.35	Predicted ATP binding, ATPase activity
16	<i>AN7385</i>	0.29	21.55	6.20	Putative phosphatidylserine decarboxylase
17	<i>AN3228</i>	0.86	56.93	6.05	Predicted prenyltransferase
18	<i>ivoC</i>	0.11	6.81	6.01	Putative cytochrome P450
19	<i>AN3339</i>	0.17	10.20	5.87	Predicted nucleotide binding, oxidoreductase activity, transferase activity
20	<i>AN3304</i>	0.11	6.22	5.85	Putative GABA transporter
Down-regulated					
1	<i>cjdB</i>	6287.20	53.25	-6.88	Putative oxidoreductase
2	<i>AN7900</i>	69.54	1.98	-5.14	Predicted nucleotide binding and oxidoreductase activity
3	<i>AN7893</i>	284.06	10.12	-4.81	Predicted oxidoreductase activity
4	<i>AN0528</i>	381.75	14.08	-4.76	Predicted role in transmembrane transport
5	<i>AN7832</i>	208.22	8.63	-4.59	Predicted flavin adenine dinucleotide binding
6	<i>AN7898</i>	156.95	6.76	-4.54	Predicted role in transmembrane transport
7	<i>AN11584</i>	222.26	9.58	-4.54	Unknown
8	<i>AN7899</i>	103.42	4.99	-4.37	Esterase/lipase
9	<i>AN7894</i>	532.06	27.54	-4.27	Unknown
10	<i>AN7897</i>	71.03	3.79	-4.23	Predicted monooxygenase activity
11	<i>AN7903</i>	7.38	0.40	-4.20	Polyketide synthase
12	<i>AN8366</i>	1365.44	96.15	-3.83	Predicted role in transmembrane transport
13	<i>AN3567</i>	112.27	8.81	-3.67	Unknown
14	<i>AN8308</i>	3496.21	285.41	-3.61	Unknown
15	<i>AN2593</i>	4.51	0.40	-3.48	Predicted monooxygenase activity
16	<i>AN8593</i>	28.86	2.72	-3.40	Predicted hydrolase activity
17	<i>AN7333</i>	8.35	0.86	-3.28	Unknown
18	<i>AN7901</i>	18.75	2.01	-3.22	Putative fungal transcription factor
19	<i>AN7902</i>	38.96	4.22	-3.21	FAD-binding monooxygenase
20	<i>AN11702</i>	2563.91	283.34	-3.18	Unknown

see also File S1). Overall, these results suggest that FlbB activity influences the expression of differentiated groups of genes at each developmental stage and that the bZIP-type transcription factor potentially has a broader role as a transcriptional activator rather than as a suppressor.

Gene expression data point to a transcriptional activity of FlbB beyond conidiation

To interpret the significance of changes in gene expression occurring as a consequence of *flbB* deletion, we sorted significantly deregulated transcripts according to their expression profile (EP). Figure 3E shows a heat map corresponding to the expression levels of significantly deregulated genes included in Table S5 and Table S6. We focus here on three EPs. Figure 3F corresponds to EP1, comprising genes significantly up-regulated in a $\Delta flbB$ background in both stages but mainly in AD. EP1 includes some of the secondary metabolism genes that will be analyzed later. Classes EP2 and EP3 comprise transcripts strongly inhibited in the null *flbB* mutant (Figure 3, G and H). Those in Figure 3H belong to class EP2 and display in the WT higher expression levels in both VG and AD. Figure 3G shows class EP3, genes with low

or very low expression in VG that are induced at the beginning of conidiophore development. Thus it could be interpreted that genes of class EP3 encode protein activities required specifically during conidiation (see later).

We also analyzed the top 20 genes with the highest (up-regulated by FlbB; $\log_2 FC > 0$) and lowest (down-regulated by FlbB; $\log_2 FC < 0$) $\log_2 FC$ values at each developmental stage (Table 1). Predictions of a function for most of these genes were obtained from the AspGD and the *Aspergillus* Comparative Database. Those coding for proteins without predicted function were placed in a group designated as "Unknown" (Table 1). Among genes with a predicted/demonstrated function, we considered first those belonging to two clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites: the recently described *dba* cluster (*An7893–An7903*) (Gerke *et al.* 2012) (Figure 3F) and the *An2030–An2038* cluster (Ahuja *et al.* 2012). Finally, genes involved in development (*i.e.*, *brlA*, *ivoB*, *ivoC*, *rodA*, and *An4394*) (Figure 3, G and H) were placed in a third group. The existence of FlbB-regulated genes with low $\log_2 FC$ values but having an important role in the control of development and/or other cellular processes could not be discarded. Nevertheless, we continued focusing our work on the

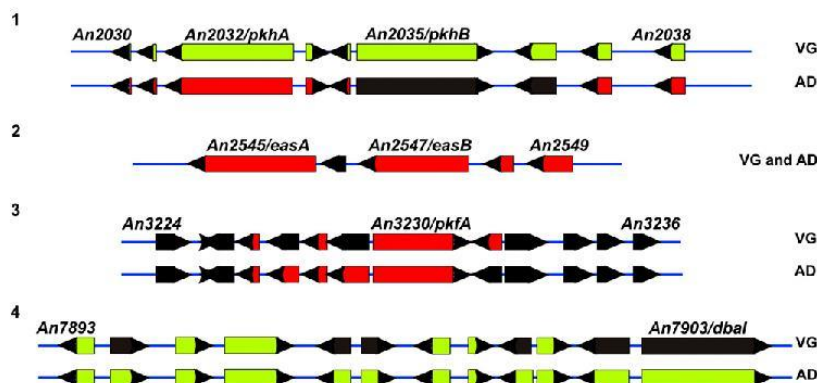


Figure 4 Expression pattern of *A. nidulans* secondary metabolite gene clusters that are significantly regulated at the VG and early AD stages. The positions of PKSs or NRPSs in each cluster are indicated as well as the first and last gene names. Non-significantly regulated genes are in black, those down-regulated by FlbB activity are in green, and those up-regulated are in red. The extension of clusters defined by *An2545/easA* and *An2547/easB* or *An3230/pkfA* was delimited according to Chiang *et al.* (2008) and Khaldi *et al.* (2010). Results published by Gerke *et al.* (2012) and our *in silico* analyses were used as the reference for the *dba* cluster. The extension of the *An2030–An2038* cluster was compared with that of Khaldi *et al.* (2010) and modified according to our *in silico* analyses (not shown).

analysis of the role of FlbB in the regulation of (1) secondary metabolite clusters and (2) developmental genes.

FlbB is required for the expression of four secondary metabolite clusters

The induction of asexual development requires the activity of specific secondary metabolites (SMs) (Ugalde and Rodriguez-Urra 2014). Genes and regulators of the biosynthesis of SMs are usually grouped in clusters within the genome [see annotation for clusters in different aspergilli in Inglis *et al.* (2013)]. Thus we analyzed our RNA-seq data to identify SM clusters with a significantly modified expression pattern in a null *flbB* background. Table S7 shows significantly regulated polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes (File S1). The information in Table S7 also indicates that there are four SM clusters with a significant expression change (Figure 4): (1) the emericellamide (EAS) cluster (*An2545–An2549*) (Chiang *et al.* 2008), which is significantly down-regulated in the null *flbB* mutant at both the VG and AD stages (Table S5 and Table S6 and Figure 3H and Figure 4); (2) the aspermidine A cluster, controlled by the PKS *An3230/pkfA*, in which a limited number of genes were significantly down-regulated in the absence of FlbB (Ahuja *et al.* 2012; Yaegashi *et al.* 2013); (3) the *An2030–An2038* cluster, which was significantly down-regulated with a functional FlbB at VG but up-regulated at AD (Table S5 and Table S6 and Figure S3, Figure S4, and Figure S5); and (4) the recently characterized *dba* cluster (*An7893–An7903*) (Gerke *et al.* 2012), which is involved in the synthesis of the secondary metabolite 2,4-dihydroxy-3-methyl-6-(2-oxopropyl)benzaldehyde (DHMBA) and is strongly up-regulated in the absence of FlbB activity at both the VG and AD (see the top 20 FlbB down-regulated genes in Table 1; see also Figure 3F).

The expression behavior of the *dba* cluster was confirmed through qPCR analysis for the VG stage and the following cluster genes (Figure 5A): *An7895/cipB*, which is the top FlbB down-regulated gene in AD, and *An7896/dbaA* and *An7901/dbaG*, which code for the two transcriptional regulators that

control the expression of the remaining *dba* genes (Gerke *et al.* 2012). We included in the analysis total RNA samples from other UDA and CDP mutants, such as $\Delta fltG$ and $\Delta brlA$ null strains (Wieser *et al.* 1994; Adams *et al.* 1998). The significantly lower ΔCt values ($= Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$) compared with the WT strain confirmed the up-regulation of these three *dba* genes in all aconidial strains assayed ($P < 0.05$ in all cases).

Synteny and BLAST analyses showed that the *dba* cluster is not conserved in other aspergilli (Figure 5B and Figure S6). However, all genes from *An7893* to *An7903* matched the position and orientation of their orthologs in another gene cluster in *Talaromyces stipitatus* (Figure 5, B and C, and Figure S6), another soil fungus. We also found metabolic clusters in human pathogens such as *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*, which contained orthologs of most of the *dba* genes. However, those genes displayed different relative position and orientation compared to the *dba* cluster (Figure 5B).

The metabolite linked to the activity of the *dba* cluster, DHMBA, has shown biological activity against the bacterium *M. luteus* (Gerke *et al.* 2012), an obligate aerobe found in soil, dust, water, and air and in a number of body tissues and secretions (Young *et al.* 2010). To verify the levels of activation and relevance of the *dba* cluster in the successful competition of *A. nidulans* with bacterial species, we cocultured $\Delta flbB$ strains (in which expression of *dba* cluster genes was induced as shown earlier) with *M. luteus* under experimental conditions suited to accurate quantitative analysis (bacteria/conidia = 25/1) (Figure 6A; see also *Materials and Methods*). After 48 hr of incubation, $\Delta flbB$ hyphae colonized the agar surface and formed aerial hyphae (black arrowhead in Figure 6A) in sharp contrast to those of the $\Delta flbB;\Delta dba$ strains, which remained submerged in the cocultured region. Bacterial load in the parental $\Delta flbB$ strain ($3.69 \times 10^8 \pm 1.23 \times 10^8$ cells/cm²) was 10-fold lower than in double-null ($\Delta flbB;\Delta dbaD$ and $\Delta flbB;\Delta dbaI$) mutants ($2.89 \times 10^9 \pm 0.51 \times 10^9$ and $2.75 \times 10^9 \pm 0.65 \times 10^9$ bacterial cells/cm², respectively; $P = 3.24 \times 10^{-7}$ and

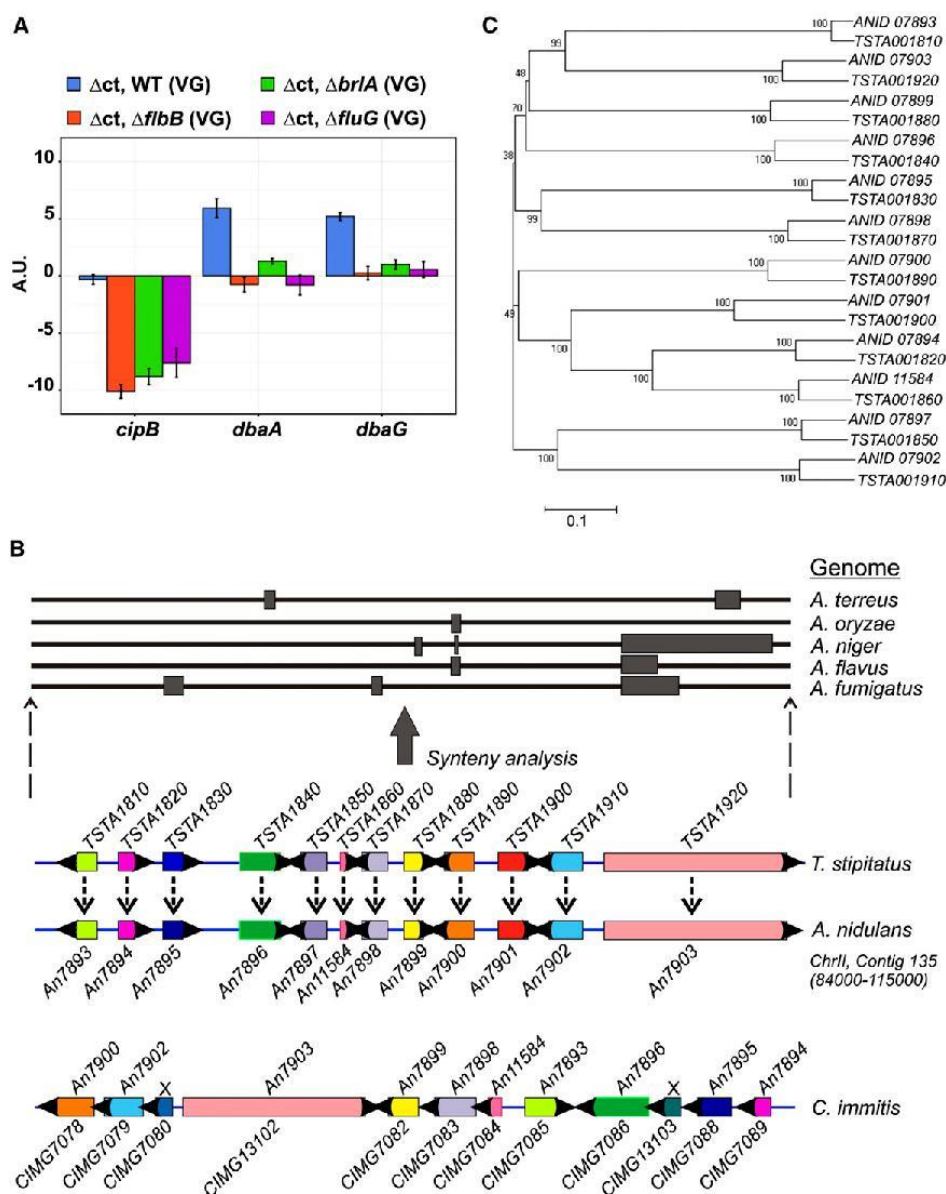


Figure 5 Analysis of the *dba* cluster. (A) qPCR analysis of the expression of *An7895/cipB*, *An7896/dbaA*, and *An7901/dbaG* genes in the WT, Δ *flbB*, Δ *brlA*, and Δ *fluG* genetic backgrounds. Δ Ct values (= $Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{control}}$) are given for VG samples of the selected strains as the mean values of three replicates together with the SEM. (B) Synteny analyses obtained from the *Aspergillus* Comparative Database (top) showed the absence of the *dba* cluster in other aspergilli such as *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, and *A. fumigatus*. Dark gray squares designate regions conserved compared with the *A. nidulans* genome. BLAST analyses showed the total conservation of the *dba* cluster in the *T. stipitatus* genome and partial conservation in the *C. immitis* genome. (C) Phylogenetic tree (Mega software) linking *dba* cluster genes with *T. stipitatus* orthologs.

4.88×10^{-6} ; $n = 9$; significant change) (Figure 6B). A similar phenotype was observed when additional (Δ *flbB*; Δ *dba*) double-null mutants were tested with increasing bacterial concentrations (Figure S7).

Taken together, the results show that the loss of FlbB activity modified the expression pattern of specific SM clusters (File S1) and that up-regulation of the *dba* cluster resulted in the production of secondary metabolites with antibiotic activity.

Global analysis of FlbB activity in the regulation of genes involved in asexual development

Considering that *A. nidulans* conidiation genes can be grouped according to their participation in the upstream developmental activation (UDA) or as *brlA*-dependent (CDP) factors, we summarize the expression levels of these genes in Table 2. Within the UDA pathway, we identified three putative targets for FlbB, all of them up-regulated by the bZIP. The role of *An4394* will be analyzed separately later. We focus here, first, on the expression of the cMyb-type UDA transcription factor-coding gene *flbD*, which was, as expected, strongly inhibited in the null *flbB* background (Garzia *et al.* 2010) at both the VG and AD stages (Figure 3H). The second FlbB up-regulated UDA gene was *tmpA*, which encodes a transmembrane flavoenzyme and was postulated to act in a parallel pathway to that of FlbG-FlbB (Soid-Raggi *et al.* 2006).

The expression of the first CDP gene, *brlA*, was completely inhibited in the absence of *flbB* at the AD stage (see class EP3 in Figure 3G), confirming the requirement of this transcription factor in the process of *brlA* activation on exposure to air. Another significantly regulated CDP gene is *rodA*, which codes for a hydrophobin (HPh) that is necessary for the generation of the rodlet layer that covers conidia (Stringer *et al.* 1991). The marked decrease in *rodA* expression observed in the AD comparison probably was a consequence of the inability to induce *brlA* in the null *flbB* mutant (Chang and Timberlake 1993). At this point, it is interesting to note that besides *rodA*, there were additional significantly deregulated genes that code for HPhs and CFEM hydrophobic proteins (Table S8 and File S1). All HPhs in *A. nidulans* have been shown recently to be involved in HPh rodlet formation on the surfaces of spores (Grünbacher *et al.* 2014). It is worth mentioning that *An6401/dewC* is the top FlbB up-regulated gene in AD, which suggests a BrlA-dependent role for it at this stage of asexual development.

Finally, the expression pattern observed in this work for *ivoB* and *ivoC*, which code for a phenol oxidase and a cytochrome P450 required for conidiophore pigmentation, respectively (Birse and Clutterbuck 1991), followed that described previously in the literature, where *ivoB* expression preceded that of *ivoC* (Birse and Clutterbuck 1991; Kelly *et al.* 2009; Garzia *et al.* 2013). The decrease in their transcription might reflect the altered *abaA* and *brlA* expression in the null *flbB* background (Birse and Clutterbuck 1991). Overall, these results support the previous model proposed by Garzia *et al.* (2010) that showed that FlbB bound the *brlA* promoter jointly with FlbD to induce the CDP pathway (see Discussion).

FlbB activity is required for the expression of *An4394*, coding for a putative helix-loop-helix (HLH)-type transcription factor that inhibits sexual development

The list of significantly regulated UDAs in Table 2 includes the gene *An4394*. According to the RNA-seq data, *An4394* displays an EP2 expression profile (Figure 3H), which means that its transcription is strongly inhibited in the $\Delta flbB$ background at

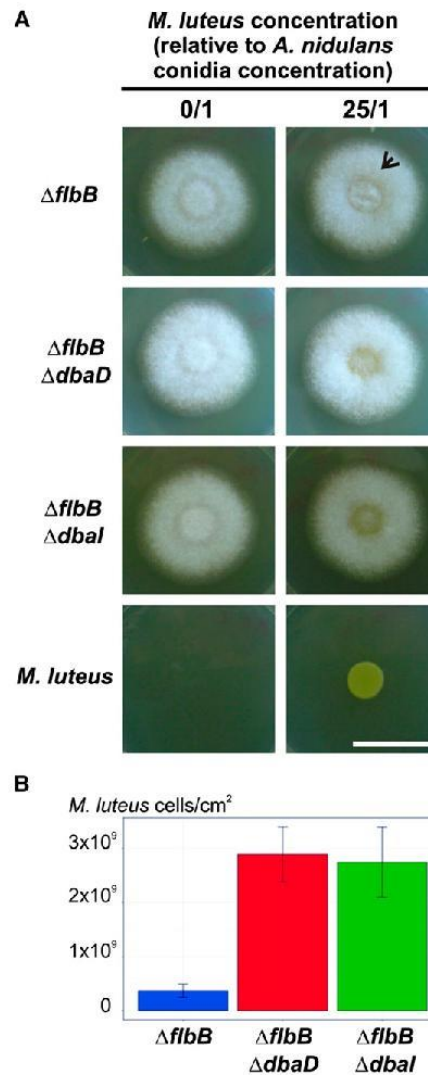


Figure 6 Cocultures of *A. nidulans* and *M. luteus*. (A) Phenotypic comparison between $\Delta flbB$ (line 1), $\Delta flbB;\Delta dbaD$ (line 2), and $\Delta flbB;\Delta dbal$ (line 3) strains after 48 hr of coculture with *M. luteus* in appropriately supplemented LB medium. Arrowheads indicate the cocultured region. The ratios between bacterial cell and fungal conidia concentrations are indicated. Control plates containing no bacterial cells or containing only the corresponding bacterial inoculum are shown as controls. Scale bar, 2 cm. (B) Average number of *M. luteus* cells after 48 hr of coculture with $\Delta flbB$ (blue), $\Delta flbB;\Delta dbaD$ (red), and $\Delta flbB;\Delta dbal$ (green) mutants. The graph illustrates the mean \pm SEM of three biological and nine technical replicates.

both the VG and AD (Table 2). In addition, the AspGD (www.aspgd.org) indicated that its orthologs were involved in the positive regulation of asexual development (see also Table 1). Thus we decided to evaluate a putative regulation of *An4394* expression by factors from the UDA or CDP pathways

Table 2 FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) values for genes involved in different aspects of conidiophore development

Locus	Type	Value of $\Delta flbB$ VG	Value of WT VG	\log_2 FC VG	Significant VG	Value of $\Delta flbB$ AD	Value of WT AD	\log_2 FC AD	Significant AD
UDA pathway									
<i>fadA/An0651</i>	Heterotrimeric G protein, subunit alpha	59.6	135.7	1.19	No	62.7	49.3	-0.35	No
<i>flbA/An5893</i>	Regulator of G-protein signaling	64.7	40.1	-0.69	No	32.7	29.9	-0.13	No
<i>flbB/An7542</i>	bZIP TF	2.1	153.3	6.18	Yes	3.0	107.6	5.18	Yes
<i>flbC/An2421</i>	C2H2 TF	69.8	223.9	1.68	No	365.4	213.5	-0.78	No
<i>flbD/An0279</i>	cMYB TF	4.0	103.1	4.70	Yes	6.6	61.3	3.22	Yes
<i>flbE/An0721</i>	Interactor of FlbB	80.2	101.6	0.34	No	37.1	42.5	0.20	No
<i>fluG/An4819</i>	Necessary for the synthesis of a inducer metabolite	16.2	36.3	1.17	No	22.0	25.4	0.21	No
<i>ganB/An1016</i>	Heterotrimeric G protein, subunit α	71.4	134.6	0.91	No	111.8	70.7	-0.66	No
<i>gpgA/An2742</i>	Heterotrimeric G protein, subunit γ	257.9	327.6	0.34	No	190.7	128.7	-0.57	No
<i>sfaD/An0081</i>	Heterotrimeric G protein, subunit β	148.2	118.6	-0.32	No	137.4	81.0	-0.76	No
<i>sfgA/An8129</i>	Gal4-type Zn(II)2Cys6 TF, negative regulator of conidiation	51.2	88.1	0.78	No	38.6	59.7	0.63	No
<i>tmpA/An0055</i>	Transmembrane flavoprotein	2.8	25.4	3.17	Yes	9.4	32.2	1.78	Yes
<i>urdA/An4394</i>	Positive regulation of asexual sporulation; regulation of transcription	3.8	143.5	5.23	Yes	2.6	66.1	4.68	Yes
CDP pathway									
<i>abaA/An0422</i>	TEA/ATTS TF	1.7	8.8	2.37	Yes	1.0	1.5	0.58	No
<i>brlA/An0973</i>	C2H2 TF	3.1	5.6	0.85	No	0.3	25.2	6.36	Yes
<i>dewA/An8006</i>	Hydrophobin	0.0	1.3	1.79769×10^{308}	No	0.3	1.1	1.96	No
<i>ivoA/An1057</i>	NRPS	0.4	1.1	1.64	No	1.0	0.8	-0.40	No
<i>ivoB/An0231</i>	Phenol oxidase	0.7	8.3	3.66	Yes	1.1	214.5	7.64	Yes
<i>ivoC/An10573</i>	Cytochrome P450	0.1	0.0	-1.79769×10^{308}	No	0.1	6.8	6.01	Yes
<i>medA/An6230</i>	Unknown	80.7	57.3	-0.49	No	52.2	36.2	-0.53	No
<i>rodA/An8803</i>	Hydrophobin	3.2	3.0	-0.09	No	0.9	93.0	6.62	Yes
<i>stuA/An5836</i>	APSES TF	143.7	190.5	0.41	No	122.3	157.8	0.37	No
<i>vosA/An1959</i>	Velvet-like TF	11.7	34.8	1.58	No	10.4	10.1	-0.04	No
<i>wA/An8209</i>	PKS	1.0	1.9	0.95	No	2.2	1.4	-0.68	No
<i>wetA/An1937</i>	Unknown	1.4	2.9	1.11	No	3.2	1.5	-1.10	No
<i>yA/An6635</i>	p-Diphenol oxidase	14.5	47.3	1.70	Yes	13.3	11.3	-0.24	No

This table has been updated from Etxebeste *et al.* (2010b). Genes have been classified according to their participation in the UDA or CDP pathways. Expression levels in each background and developmental stage, \log_2 FC values for VG and AD comparisons, and the significance of the expression differential are included. Bold signifies genes significantly up-regulated by FlbB activity

(Figure 7). Northern blots showed an increase in *An4394* expression after the induction of conidiation, followed by its inhibition after 24 and 48 hr (Figure 7A, top). In contrast to our RNA-seq results, the *An4394* transcript was not detected in the VG (0 hr) in these experiments. This observation is in agreement with results described by Sibthorp *et al.* (2013) that reported low reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) levels for *An4394* in either minimal or complete *Aspergillus* culture medium. Furthermore, we were unable to

detect the *An4394::GFP* chimera in vegetative hyphae either by fluorescence microscopy or by Western blot. These results strongly support the view that *An4394* expression is low at the VG.

Northern blot experiments also confirmed the inhibition of *An4394* expression in a null *flbB* background (Figure 7A). The same effect was observed in null mutants of UDA genes such as *flbE*, *flbD*, and *gmcA* (Etxebeste *et al.* 2012). Interestingly, the *An4394* transcript was overexpressed in the

$\Delta brlA$ background (Figure 7A, bottom). This suggested that while the UDA pathway induced *An4394* expression, the CDP pathway inhibited it. The maintenance of the *flbB* expression peak in a $\Delta An4394$ strain compared with the parental WT strain (Figure 7B) confirmed that *An4394* is located downstream of known *flb* genes in the UDA pathway. Furthermore, we could confirm that the expression of two secondary metabolism genes from the *dba* cluster (*An7895/cipB* and *An7898/dbaD*; see earlier) was strongly up-regulated not only in the $\Delta flbB$ background but also in $\Delta flbD$ and $\Delta An4394$ strains. These results and those in previous sections of this paper strongly suggest that the up-regulation of the *dba* cluster initially described for the null *flbB* mutant is not specific to this strain.

To further understand the role of *An4394* in *A. nidulans* development, we characterized the phenotype of its deletion mutant. Colonies of the $\Delta An4394$ strain showed a marked inhibition of asexual development on MMA (Figure 8A; 48 and 72 hr). Conidia production in the $\Delta An4394$ strain ($3.6 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^5$ conidia/cm²) was 27 times lower than that in the parental WT strain ($9.6 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$ conidia/cm²) (Figure 8B, top). Premature onset of the sexual process also was observed, with profuse production of Hülle cells after only 4 days of culture at 37° (Figure 8A; 96 hr and the magnifications following). After 7 days, the null *An4394* mutant produced mature cleistothecia containing viable ascospores (2515 ± 157 cleistothecia/cm²) (Figure 8B, bottom) that germinated and developed mycelia normally (see the inset in Figure 8C corresponding to 48 hr of culture of ascospores in MMA at room temperature). The parental WT strain had initiated the development of cleistothecia after 7 days of culture (478 ± 67 cleistothecia/cm²) (Figure 8B, bottom), but these sexual structures were immature and contained no ascospores (not shown). The reversion of the $\Delta An4394$ phenotype in a revertant strain was accompanied by a recovery of WT expression levels of *An4394* and *An7895/cipB* strains (Figure S8; see also *Materials and Methods*). This confirmed that the phenotype of the $\Delta An4394$ strain was the consequence of the deletion of this gene. Based on the results shown, *An4394* was named *UrdA* because of its UDA-dependent role in the regulation of development in *A. nidulans* (see *Discussion*).

The *urdA* transcript sequence obtained from our RNA-seq approach matched the one predicted by the AspGD. Synteny analyses using this database showed that *urdA* orthologs are conserved at equivalent regions within the genomes of multiple aspergilli (not shown). The *A. oryzae* ortholog codes for the HLH-type transcription factor EcdR (early conidiophore development regulator) (Jin *et al.* 2011a). Sequence alignments for *UrdA* and EcdR, on the one hand [43.1% overall identity according to Jin *et al.* (2011a)] (Figure 8D), or *UrdA* and orthologs from closely related fungal species, on the other hand (Figure S9), demonstrate that the homology is not confined to the putative bHLH domain (black arrows in Figure 8D) [the extension of the EcdR bHLH domain, residues 150–211, was delimited by Jin *et al.* (2011a)].

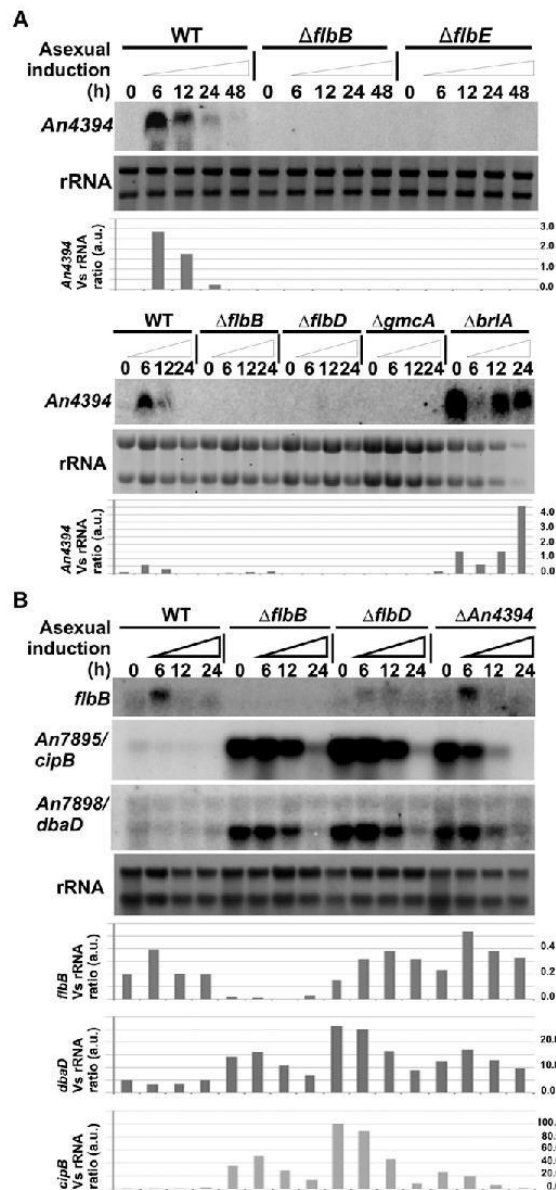


Figure 7 Regulation of *urdA/An4394*. (A) Northern blot experiments showing the expression of *An4394*, coding for the *A. nidulans* ortholog of the HLH-type transcription factor EcdR from *A. oryzae*, in WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbE$ (top), $\Delta flbD$, $\Delta gmcA$, and $\Delta brlA$ (bottom) genetic backgrounds. (B) Northern blot experiments showing the expression of *flbB*, *An7895/cipB*, and *An7898/dbaD* in WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$, and $\Delta An4394/urdA$ strains at different time points of asexual development. rRNAs are shown as loading control in both panels. The graphs show the ratios between the average pixel intensity of each Northern blot band and the corresponding rRNA band. Graphs were obtained with Microsoft Excel, and the average pixel intensity for each band was calculated with Image Gauge (version 4.0; Fujifilm, Valhalla, NY).

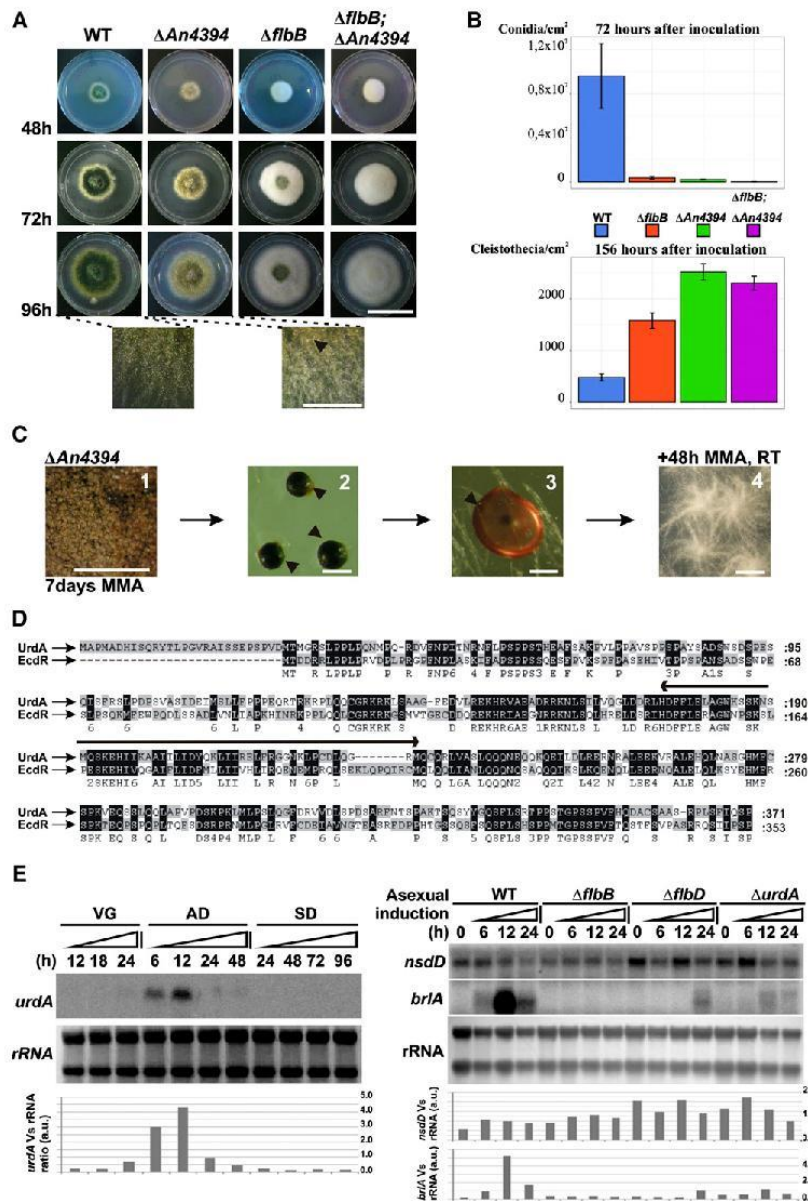


Figure 8 Functional characterization of UrdA. (A) Phenotype of the $\Delta An4394$ mutant in MMA after 48, 72, and 96 hr of culture at 37°. Scale bar, 3 cm. Magnifications show the high number of Hülle cells produced by the null *An4394* (black arrowhead, right) compared with the WT strain (left) after 96 hr of culture. Scale bar, 0.2 cm. (B) Conidia and cleistothecia production by the parental strains (WT and $\Delta flbB$) and *An4394* null mutants (in both parental genetic backgrounds) in MMA plates after 72 and 156 hr of culture at 37°, respectively. Values are the mean of three replicates plus SEM. (C) (1) Phenotype of the *An4394* null mutant after 7 days of culture in MMA. (2) Cleistothecia were isolated, (3) burst, and ascospores were cultivated in MMA for additional 48 hr at room temperature. (4) Phenotype of germinated $\Delta An4394$ colonies is shown. Scale bars, (1) 0.2 cm; (2) 100 μm; (3) 0.3 mm; (4) 3 mm. (D) Sequence alignment of UrdA and EcdR, which was obtained using Genedoc software (version 2.7.000). The extension of the bHLH domain of EcdR is designated by black arrows and was delimited according to Jin *et al.* (2011a). (E) Northern blot experiments showing the expression of *urdA* during morphogenesis (12, 18, and 24 hr of VG) as well as asexual (6, 12, 24, and 48 hr of AD) and sexual (24, 48, 72, and 96 hr of SD) developmental cycles (left) or the expression of *brlA* and *nsdD* in WT, $\Delta flbB$, $\Delta flbD$, and $\Delta An4394/urdA$ strains at different time points of asexual development (right). rRNAs are shown as loading control in both panels. The graphs show the ratios between the average pixel intensity of each Northern blot band and the corresponding rRNA band.

Lee *et al.* (2014) have recently proposed that Flbs induce conidiation by simultaneously suppressing the *brlA* down-regulation caused by NsdD, a positive regulator of cleistothecia production (Han *et al.* 2001). To analyze whether the genetic relationship between Flbs and NsdD could be established through UrdA, we performed new Northern blot experiments. On the one hand, we could not detect the *urdA* transcript during the sexual development (SD in Figure 8E, left), suggesting that UrdA plays no role in sexual differentiation. On the other hand, we observed no remarkable differences in *nsdD*

expression levels in a $\Delta urdA$ background (Figure 8E, right) (a *brlA* probe was used as control), suggesting that the premature triggering of sexual development described for the null *urdA* mutant was not the consequence of an up-regulation of *nsdD*. These results strongly suggest that *nsdD* expression is not subject to UrdA control.

Overall, UrdA codes for a putative transcription factor located downstream of Flbs in the induction pathway and required not only for the correct development of conidiophores but also for the inhibition of sexual development (see later).

Discussion

According to the currently accepted model of the transcriptional activity of FlbB, it first induces the expression of *flbD*, and subsequently, both factors jointly activate *brlA* (Garzia *et al.* 2010). Results obtained in this work reinforce this model (Figure 9). On the one hand, RNA-seq confirms that the absence of FlbB results in a block of *brlA* expression after exposure of the hyphae to air (Wieser *et al.* 1994). On the other hand, *flbD* remains as the only known *flb* gene showing a transcriptional dependence on FlbB activity. Nevertheless, this work demonstrates that FlbB reaches beyond the induction of *brlA* expression and has a key role in modulating the timing of mutually exclusive morphogenetic programs such as asexual and sexual reproductive cycles (Figure 9). This function is exerted through UrdA because the absence of this hypothetical transcriptional regulator prematurely induces the sexual cycle and inhibits conidia production. Thus we propose that UrdA connects the UDA pathway with the control of sexual development.

A recent report provided experimental evidence of a functional link between the UDA pathway and the positive regulator of sexual development NsdD (Lee *et al.* 2014). Because *nsdD* deletion bypassed the need of UDAs (but not CDPs) for conidia production, the authors proposed that NsdD also down-regulated *brlA* expression to inhibit the asexual program. Our results show that UrdA does not control *nsdD* expression, suggesting that sexual and asexual developmental pathways are coordinated at different levels (Figure 9). Jin *et al.* (2011a) indicated that the *A. oryzae* ortholog of UrdA, EcdR, is required for early asexual development and proposed that it was repressed by its interaction with SclR, an additional HLH-type transcription factor that promotes sclerotial formation (Jin *et al.* 2011b). However, expression of the putative ortholog of *sclR*, *An7170*, is not significantly altered when *flbB* is deleted. This suggests that the UDA pathway inhibits sexual development through the activation of *urdA* but not the inhibition of *An7170*. Although identification of the genetic target(s) of UrdA activity remains elusive, the existence of proteins linking the UDA pathway with sexual reproduction fits with the idea that specific proteins and endogenous metabolites coordinate the morphogenetic programs to shape the fungal colony and suit the environmental conditions (Rodríguez-Romero *et al.* 2010; Park and Yu 2012; Ugalde and Rodríguez-Urra 2014).

It is known that development is tightly linked with the production of SMs. Activation of a particular developmental pathway entails the induction of specific SM clusters. In this work, we show experimental evidence of an up-regulation of the *dba* cluster resulting from deletion of UDA and CDP genes such as *flbB*, *flbD*, *fluG*, *urdA*, and *brlA* (Figure 9). An induction of the *dba* cluster also has been reported, on the one hand, when the signalosome, a multimeric complex involved in protein degradation, lacks the subunit CsnE (Gerke *et al.* 2012) and, on the other hand, on physical contact with the bacterium *Streptomyces hygrosopicus* (Schroeckh *et al.* 2009). In these two studies, the authors

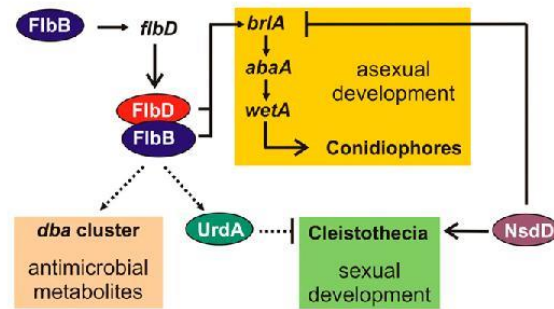


Figure 9 Known roles of FlbB in the genetic control of asexual and sexual development as well as secondary metabolite production.

described a simultaneous up-regulation of *dba* genes and genes from the adjacent orsellinic acid cluster. Consequently, it was proposed that the regulation of both clusters might be linked and that they might cooperate in the production of SMs (Nielsen *et al.* 2011; Gerke *et al.* 2012). However, our RNA-seq data show that the deletion of *flbB* up-regulates the *dba* cluster but not the orsellinic acid cluster, suggesting an independent regulation for both gene clusters. Although the biological meaning of this observation remains unknown, recent studies on the role of SM clusters suggest that different metabolites can be generated by the same PKS (Zaehle *et al.* 2014). This has been defined as the promiscuity of PKSs and may contribute to the increase in SM diversity (Fischer 2014).

Conservation of the *dba* cluster between *A. nidulans* and *T. stipitatus* seems to be the consequence of a horizontal gene-transfer (HGT) process. Although we could not identify transposable elements, this hypothesis is supported by the absence of an equivalent cluster in other aspergilli and its location near a telomere on chromosome II (Milani *et al.* 2012). This hypothetical HGT process could have implications on the capability of these two fungal species to survive in an ecological niche in competition with other microorganisms. In fact, the metabolite DHMBA, produced by the *dba* cluster, inhibits growth of the bacterium *M. luteus* (Gerke *et al.* 2012). Therefore, it is reasonable to suggest that induction of the *dba* cluster could be a response to biotic stress conditions. In this context, the absence of an active signalosome (Gerke *et al.* 2012) could simulate specific effects caused by the competition with other microorganisms and thus activate the production of defense metabolites such as DHMBA. Similarly, the block in asexual development caused by the absence of UDA activity (Etxebeste *et al.* 2010a) could be construed by the fungus as a signal for the synthesis of a chemical compound with biological activity.

Overall, this work analyzed two remarkable examples on how developmental and metabolic processes are unbalanced when UDA activities are absent. However, the large number of purportedly deregulated genes identified in our RNA-seq comparisons points to the existence of multiple cellular processes influenced by FlbB activity. GO functional enrichment analyses (not shown) indicate that oxidation-reduction,

transmembrane transport, and metabolic processes, as well as the regulation of transcription and translation, are importantly affected. It can be inferred, therefore, that the direct or indirect influence of UDAs on all these processes falls within the wide scope of processes involved in the cellular transition from vegetative hypha to formation of the conidiophore. This opens a new holistic outlook to the study of regulatory networks during development.

Acknowledgments

We thank Vladimir Benes and his GeneCore Service at the EMBL (Heidelberg, Germany) for help in RNA sequencing and Francisco Codoñer from LifeSequencing (University of Valencia Scientific Park, Paterna, Spain) for assistance in data processing. We sincerely thank Julio Rodríguez-Romero and Reinhard Fischer (University of Karlsruhe) for their assistance in RNA extraction and data processing and Erika Herrero-García for her help in the Northern blot experiments. This work was supported by the Basque Government through Grant IT599-13 and the Ministerio de Economía y Competitividad (formerly Ministerio de Ciencia e Innovación) through Grant BFU2010-17528 to U.U. and Grant BFU2012-33142 to E.A.E. A.G. was a contract researcher at the University of The Basque Country (UPV/EHU), and E.O.-A. holds a predoctoral fellowship there. O.E. was a contract researcher associated with Grant BFU2010-17528 and is now a Lecturer at the University of The Basque Country.

Literature Cited

- Adams, T. H., J. K. Wieser, and J.-H. Yu, 1998 Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 35–54.
- Ahuja, M., Y. M. Chiang, S. L. Chang, M. B. Praseuth, R. Entwistle *et al.*, 2012 Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 8212–8221.
- Baidya, S., J. W. Cary, W. S. Grayburn, and A. M. Calvo, 2011 Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5524–5528.
- Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi, and I. Golani, 2001 Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125: 279–284.
- Birse, C. E., and A. J. Clutterbuck, 1991 Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase-encoding gene, *ivoB*. *Gene* 98: 69–76.
- Chang, Y. C., and W. E. Timberlake, 1993 Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* 133: 29–38.
- Chiang, Y. M., E. Szewczyk, T. Nayak, A. D. Davidson, J. F. Sanchez *et al.*, 2008 Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 15: 527–532.
- Etxebeste, O., A. Garzia, E. A. Espeso, and U. Ugalde, 2010a *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18: 569–576.
- Etxebeste, O., E. Herrero-García, M. S. Cortese, A. Garzia, E. Oiarzabal-Arango *et al.*, 2012 GmcA is a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 7: e40292.
- Etxebeste, O., M. Ni, A. Garzia, N. J. Kwon, R. Fischer *et al.*, 2008 Basic-Zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 7: 38–48.
- Etxebeste, O., U. Ugalde, and E. A. Espeso, 2010b Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11: 704–718.
- Fischer, R., 2014 Promiscuity breeds diversity: the role of polyketide synthase in natural product biosynthesis. *Chem. Biol.* 21: 701–702.
- Fischer, R., and U. Kues, 2006 Asexual sporulation in mycelial fungi, pp. 263–292 in *Growth, Differentiation, and Sexuality* (The Mycota, Vol. 1), edited by U. Kues, and R. Fischer. Springer, Berlin.
- Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, R. Fischer, E. A. Espeso *et al.*, 2009 *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* 71: 172–184.
- Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, U. Ugalde, and E. A. Espeso, 2010 The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 75: 1314–1324.
- Garzia, A., O. Etxebeste, J. Rodríguez-Romero, R. Fischer, E. A. Espeso *et al.*, 2013 Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 12: 311–321.
- Gerke, J., O. Bayram, K. Feussner, M. Landesfeind, E. Shelest *et al.*, 2012 Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8234–8244.
- Grünbacher, A., T. Throm, C. Seidel, B. Gutt, J. Rohrig *et al.*, 2014 Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS ONE* 9: e94546.
- Han, K. H., K. Y. Han, J. H. Yu, K. S. Chae, K. Y. Jahng *et al.*, 2001 The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 41: 299–309.
- Inglis, D. O., J. Binkley, M. S. Skrzypek, M. B. Arnaud, G. C. Cerqueira *et al.*, 2013 Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* 13: 91.
- Jin, F. J., M. Nishida, S. Hara, and Y. Koyama, 2011a Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix transcription factor involved in the early stage of conidiophore development in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 48: 1108–1115.
- Jin, F. J., T. Takahashi, K. Matsushima, S. Hara, Y. Shinohara *et al.*, 2011b SclR, a basic helix-loop-helix transcription factor, regulates hyphal morphology and promotes sclerotial formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* 10: 945–955.
- Kafer, E., 1965 Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52: 217–232.
- Kelly, D. E., N. Krasevec, J. Mullins, and D. R. Nelson, 2009 The CYPome (cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 46(Suppl. 1): 53–61.
- Khaldi, N., F. T. Seifuddin, G. Turner, D. Haft, W. C. Nierman *et al.*, 2010 SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* 47: 736–741.
- Lee, M. K., N. J. Kwon, J. M. Choi, I. S. Lee, S. Jung *et al.*, 2014 NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 197: 159–173.
- Milani, N. A., D. P. Lawrence, A. E. Arnold, and H. D. VanEtten, 2012 Origin of pisatin demethylase (PDA) in the genus *Fusarium*. *Fungal Genet. Biol.* 49: 933–942.
- Mims, C. W., W. D. Richardson, and W. E. Timberlake, 1988 Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* 244: 132–141.

- Ni, M., N. Gao, N.-J. Kwon, K.-S. Shin, and J.-H. Yu, 2010 Regulation of *Aspergillus* conidiation, pp. 557–576 in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, edited by K. A. Borkovich, and D. J. Ebbole. ASM Press, Washington, DC.
- Nielsen, M. L., J. B. Nielsen, C. Rank, M. L. Klejnstrup, D. K. Holm *et al.*, 2011 A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 321: 157–166.
- Park, H. S., and J. H. Yu, 2012 Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 669–677.
- Rodríguez-Romero, J., M. Hedtke, C. Kastner, S. Müller, and R. Fischer, 2010 Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 585–610.
- Schroeckh, V., K. Scherlach, H. W. Nutzmans, E. Shelest, W. Schmidt-Heck *et al.*, 2009 Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 14558–14563.
- Sibthorp, C., H. Wu, G. Cowley, P. W. Wong, P. Palaima *et al.*, 2013 Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. *BMC Genomics* 14: 847.
- Soid-Raggi, G., O. Sanchez, and J. Aguirre, 2006 TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 59: 854–869.
- Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake, 1991 Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* 5: 1161–1171.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington *et al.*, 1983 Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205–221.
- Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim *et al.*, 2012 Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat. Protoc.* 7: 562–578.
- Ugalde, U., and A. B. Rodríguez-Urra, 2014 The Mycelium Blueprint: insights into the cues that shape the filamentous fungal colony. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 8809–8819.
- Wieser, J., B. N. Lee, J. Fondon, III, and T. H. Adams, 1994 Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27: 62–69.
- Yaegashi, J., M. B. Praseuth, S. W. Tyan, J. F. Sanchez, R. Entwistle *et al.*, 2013 Molecular genetic characterization of the biosynthesis cluster of a prenylated isoindolinone alkaloid aspermidine A in *Aspergillus nidulans*. *Org. Lett.* 15: 2862–2865.
- Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies *et al.*, 2004 Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3: 1359–1362.
- Young, M., V. Artsatbanov, H. R. Beller, G. Chandra, K. F. Chater *et al.*, 2010 Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. *J. Bacteriol.* 192: 841–860.
- Zaehle, C., M. Gressler, E. Shelest, E. Geib, C. Hertweck *et al.*, 2014 Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. *Chem. Biol.* 21: 719–731.

Communicating editor: A. P. Mitchell

Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells

Erika Herrero-Garcia,^{1†}
Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi,^{2†}
Marc S. Cortese,² Ane Markina-I arrairaegui,²
Elixabet Oartzabal-Arano,² Oier Etxebeste,^{2*}
Unai Ugalde² and Eduardo A. Espeso¹

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

²Biochemistry II laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, 20018 San Sebastian, Spain.

Summary

In *Aspergillus nidulans*, asexual differentiation requires the presence of the transcription factor FlbB at the cell tip and apical nuclei. Understanding the relationship between these two pools is crucial for elucidating the biochemical processes mediating conidia production. Tip-to-nucleus communication was demonstrated by photo-convertible FlbB::Dendra2 visualization. Tip localization of FlbB depends on Cys382 in the C-terminus and the bZIP DNA-binding domain in the N-terminus. FlbE, a critical FlbB interactor, binds the bZIP domain. Furthermore, the absence of FlbE results in loss of tip localization but not nuclear accumulation. *flbE* deletion also abrogates transcriptional activity indicating that FlbB gains transcriptional competence from interactions with FlbE at the tip. Finally, a bipartite nuclear localization signal is required for nuclear localization of FlbB. Those motifs of FlbB may play various roles in the sequence of events necessary for the distribution and activation of this transcriptionally active developmental factor. The tip accumulation, FlbE-dependent activation, transport and nuclear import sketch out a process of relaying an environmentally triggered signal from the tip to the nuclei. As the first known instance of transcription factor-mediated tip-to-nucleus communication in filamentous fungi, this provides a general framework for analyses focused on elucidating the set of molecular

mechanisms coupling apical signals to transcriptional events.

Introduction

Cell polarity is implicated in differentiation, proliferation and morphogenesis of both unicellular and multicellular organisms (Li and Gundersen, 2008). Polarization can increase the distance between the polarity site and the nucleus to several micrometers or even centimeters. Such distances have led to the development of mechanisms for facilitating pole-to-nucleus transduction of signals, such as synapse-to-nucleus transport of transcription factors (TFs) in neurons (Ben-Yaakov *et al.*, 2012).

Vegetative cells, also called hyphae, are the characteristic polar cells of filamentous fungi, eukaryotic organisms comprising many agriculturally, industrially and clinically important species. Hyphae are non-specialized multinucleated cells that extend by polarized delivery of cell wall and plasma membrane components to the tip (Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001; Riquelme, 2013; Takeshita *et al.*, 2014; Penalva, 2015). Polarized extension of hyphae is maintained by the coupling of endocytic and exocytic machineries at the cell apex (Arajo-Bazán *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay and Shaw, 2008). This mode of cellular growth is sustained until specific stimuli induce the generation of asexual reproductive structures called conidiophores. Production of conidia, asexual spores, constitutes the main vehicle of propagation in filamentous fungi. Two genetic pathways control asexual development in the filamentous fungal model *Aspergillus nidulans*. The central developmental pathway (CDP) controls the formation of conidia, whereas the upstream developmental activators (UDAs) sense the environment and induce the expression of the first CDP regulator, *brlA* (Adams *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 2006).

UDA activity is tightly coupled with the machinery that sustains hyphal growth. The bZIP TF FlbB is transported to the tip of vegetative hyphae in an actin-dependent manner and subsequently forms a complex with FlbE, also an UDA member (Garzia *et al.*, 2009; 2010). Besides the tip, FlbB also accumulates in nuclei, with the highest concentration found in the most apical nucleus and steadily decreasing quantities in successive nuclei (Etxebeste *et al.*, 2008). In this work, we have analyzed the relationship between the

Accepted 6 August 2015. *For correspondence. E-mail oier.echeveste@ehu.es; Tel. (+34) 943 015452; Fax (+34) 943 015270. †These authors contributed equally.

apical and nuclear pools of FlbB, the existence of a tip-to-nucleus retrograde transport of the TF and factors contributing to the preferential localization within the apical nucleus. We show that tip localization of FlbB is a prerequisite for its competence for induction of *brlA* expression. Furthermore, a bipartite nuclear localization signal (NLS) is required for nuclear accumulation of FlbB, whereas the bZIP domain mediates the interaction with FlbE and apical localization. A C-terminal cysteine residue also contributes to tip localization and is necessary for the interaction between FlbB and FlbE. Taken together, these results show that nuclei are asymmetrically fed with a transcriptionally active pool of FlbB originating at the tip, reinforcing the hypothesis that the tip-to-nucleus communication in hyphae is a key event controlling developmental transitions in filamentous fungi.

Results

Increasing FlbB levels modify the pattern of nuclear but not apical localization

The specific cellular distribution of FlbB could be the result of low levels of the protein (Etxebeeste *et al.*, 2010). To investigate this phenomenon further, we altered the pattern of *flbB* expression within vegetative hyphae through constitutive upregulation driven by the *gpdA^{mini}* promoter (Pantazopoulou and Pealva, 2009). We generated $\Delta flbB$ strains containing one, two or multiple copies of the *pgpdA^{mini}::GFP::FlbB* plasmid respectively (1 \times , 2 \times or $n\times$ in Fig. 1, respectively). FlbB accumulated at the tip of hyphae and preferentially at the most apical nucleus in strains expressing either GFP::FlbB or FlbB::GFP chimeras driven by the endogenous *flbB* promoter, *flbB^P* (Etxebeeste *et al.*, 2008; Fig. 1A). In contrast, fluorescent chimeras of FlbB driven by *gpdA^{mini}* promoter maintained the localization at the tip of the cell (asterisks in Fig. 1A) but showed loss of the preferential accumulation at the most apical nucleus. Higher levels of the GFP::FlbB fusion were detected by Western blot as the number of integrated *pgpdA^{mini}::GFP::FlbB* plasmid copies increased (Fig. 1B). This was accompanied by an increase in the nuclear pool of GFP::FlbB. All nuclei in a cell compartment presented a 1:1 fluorescence intensity ratio between the first and the second nuclei [mean \pm standard deviation (SD): 1.02 \pm 0.10; 1.08 \pm 0.09; and 1.02 \pm 0.16 for strains expressing one, two or multiple copies of the plasmid, respectively], compared to a ratio of 1.48 \pm 0.25 in the GFP::FlbB strain driven by the native promoter ($n = 15$ hyphae; Fig. 1C). Even so, the apical fluorescence levels did not increase proportionally to nuclear intensity. The ratio between first (apical) nucleus and tip fluorescence increased significantly, giving values of 0.96 \pm 0.22, 1.39 \pm 0.44 and 1.78 \pm 0.35 for single, double and multi-

ple copy strains, respectively, compared to a ratio of 0.64 \pm 0.18 in the reference strain ($n = 15$ hyphae of each strain; Fig. 1C; $P < 0.05$ between single copy and multiple copy strains).

Increasing nuclear levels of the *gpdA^{mini}*-driven GFP::FlbB chimera did not have an appreciable effect in conidia production of strains containing one or two copies of the *pgpdA^{mini}::GFP::FlbB* plasmid (Fig. 1D). These strains produced $7.00 \times 10^7 \pm 0.75 \times 10^7$ and $7.42 \times 10^7 \pm 1.16 \times 10^7$ conidia cm^{-2} , respectively, similar to the $6.03 \times 10^7 \pm 1.23 \times 10^7$ conidia cm^{-2} collected for the WT strain ($P > 0.05$ in both comparisons). In the multiple copy strain, we measured a significant reduction in the quantity of conidia relative to the WT strain ($1.32 \times 10^7 \pm 0.22 \times 10^6$ conidia cm^{-2} ; $P < 0.05$). However, the phenotype of the multicopy strain was not *fluffy* and exhibited conidia production sufficient to suggest that FlbB was still able to induce *brlA* expression.

Taken together, these results show that nuclear localization of FlbB is not restricted among nuclei in a cell compartment but apical accumulation is limited, suggesting the importance of this compartment for the transcriptional activity of FlbB.

A bipartite NLS domain is required for the nuclear accumulation of FlbB

In silico analyses revealed the presence of a putative NLS within residues K57-R96. This region was further restricted to amino acids from K57 to K72 due to the fact that it encompasses all the observed sequence similarities with consensus bipartite NLSs. In FlbB, we found a KK-X(8)-KRRG motif (green color in Fig. 2A and B), which is widely conserved within FlbB orthologs (Cortese *et al.*, 2011), and is in a good match to the KR/KK-X(10-12)-KRRK bipartite-NLS consensus sequence (Fontes *et al.*, 2003). In a previous work, we showed that the Gly residue (G70) within this hypothetical NLS served to increase the DNA-binding efficiency of FlbB (Etxebeeste *et al.*, 2009). In the present work, we have analyzed the role of this domain in the nuclear import of FlbB. With this aim, we replaced amino acids K67 and R68 (Fig. 2B) by alanines and studied the effect of these mutations on the localization of FlbB. For simplicity, the acronym NLS* will be used for K67A;R68A mutants.

GFP::FlbB^(NLS*), FlbB^(NLS*)::GFP and *gpdA^{mini}*::GFP::FlbB^(NLS*) strains showed an aconidial phenotype similar to that of the null *flbB* mutant (FlbB^(NLS*)::GFP is shown in Fig. 2C). Thus, substitutions of K67 and R68 with alanines strongly affected the function of FlbB. In both GFP::FlbB^(NLS*) and FlbB^(NLS*)::GFP strains, FlbB was detected at the tip (the latter strain is compared with the wild-type (WT) chimera in Fig. 2D). However, nuclear accumulation of FlbB was strongly reduced in the NLS* mutant, being

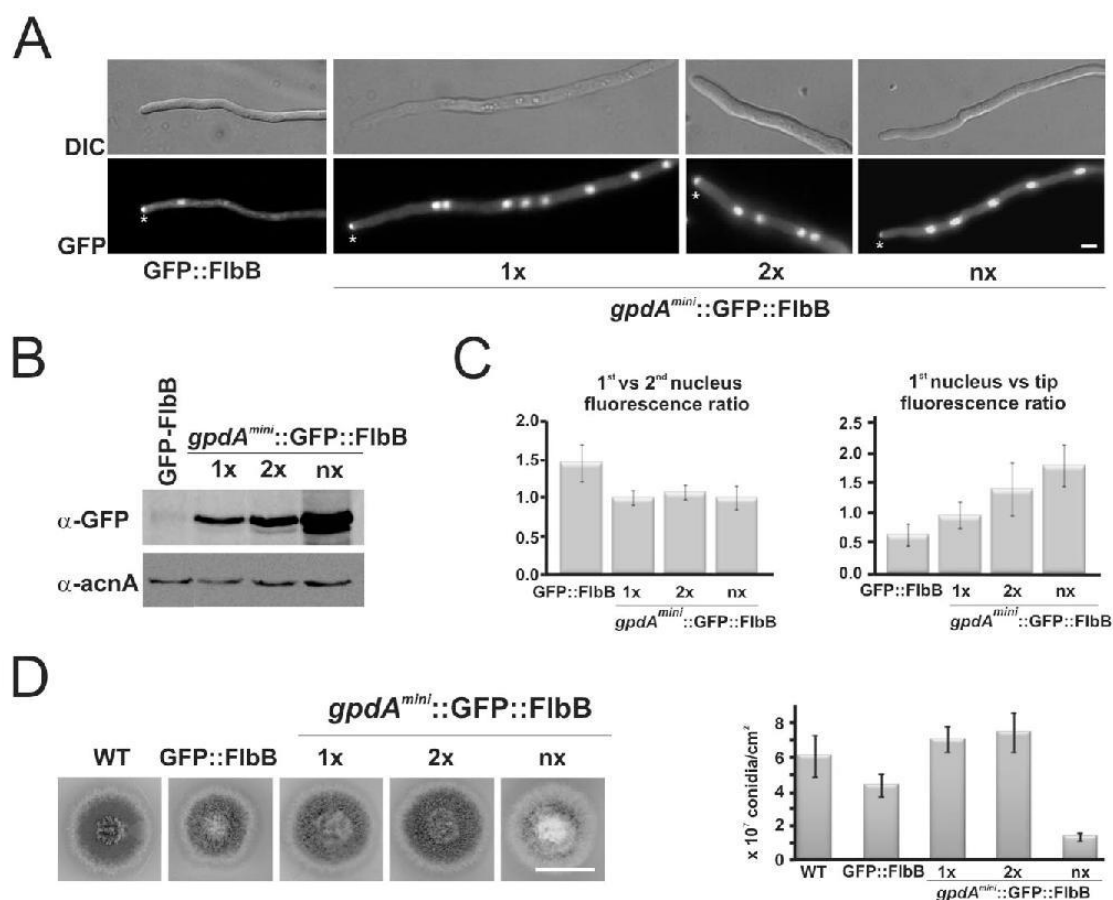


Fig. 1. Overriding the asymmetric nuclear distribution of FibB by constitutive expression.

A. Subcellular localization of GFP::FibB in cells from strains expressing one, two or multiple copies of the *pgpA^{mini}::GFP::FibB* plasmid. Scale bar = 5 μ m.

B. Western blot showing protein levels of the GFP::FibB fusion in strains carrying different copies of *pgpA^{mini}::GFP::FibB*. GFP::FibB protein is barely detected when expressed by *flbB^P* compared with *gpdA^{mini}* (exposure time: 1 min). α -actin was used as loading control.

C. Comparison of the fluorescence levels of the first two nuclei (left graph; 1.48 ± 0.25 , 1.02 ± 0.10 , 1.09 ± 0.09 and 1.02 ± 0.16 , respectively) or the first nucleus and the tip (right graph; 0.64 ± 0.18 , 0.96 ± 0.22 , 1.39 ± 0.44 and 1.78 ± 0.35 , respectively) in cells of each strain. Values are the mean of fifteen measurements plus SD.

D. Phenotypes of *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB strains after 72 h of incubation. Scale bar = 2 cm. The graph on the right shows a quantification of the conidial production for each strain. Values ($6.03 \times 10^7 \pm 1.23 \times 10^7$, $4.31 \times 10^7 \pm 0.65 \times 10^7$, $7.00 \times 10^7 \pm 0.75 \times 10^7$, $7.42 \times 10^7 \pm 1.16 \times 10^7$ and $1.32 \times 10^7 \pm 0.22 \times 10^7$) are the mean of three replicates plus s.e.m.

barely detectable at the most apical nucleus, as indicated by colocalization analyses with a mCherry or mRFP-tagged Histone H1 (Fig. 2D). Measurements of the fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus showed an increase from 1.50 ± 0.40 in the WT to 2.60 ± 0.90 in the NLS* mutant ($n = 20$ hyphae; $P < 0.05$).

The nuclear fluorescence of the *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB^(NLS*) chimera was significantly altered compared to the WT, as the ratio between the tip and the apical

nucleus increased from 1.03 ± 0.22 to 1.31 ± 0.48 ($n = 20$; $P < 0.05$; Fig. 2E). Furthermore, we measured a significant increase in the cytoplasmic levels of FibB. The tip versus cytoplasm fluorescence ratio decreased from 4.31 ± 0.89 in the WT to 3.00 ± 1.05 in the NLS* mutant ($n = 20$; $P < 0.05$), whereas the apical nucleus versus cytoplasm ratio decreased from 4.28 ± 0.97 in the WT to 2.35 ± 0.54 in the NLS* mutant ($n = 20$; $P < 0.05$). This can be interpreted as free FibB protein accumulating in the cytoplasm due to a reduced transport into the nuclei.

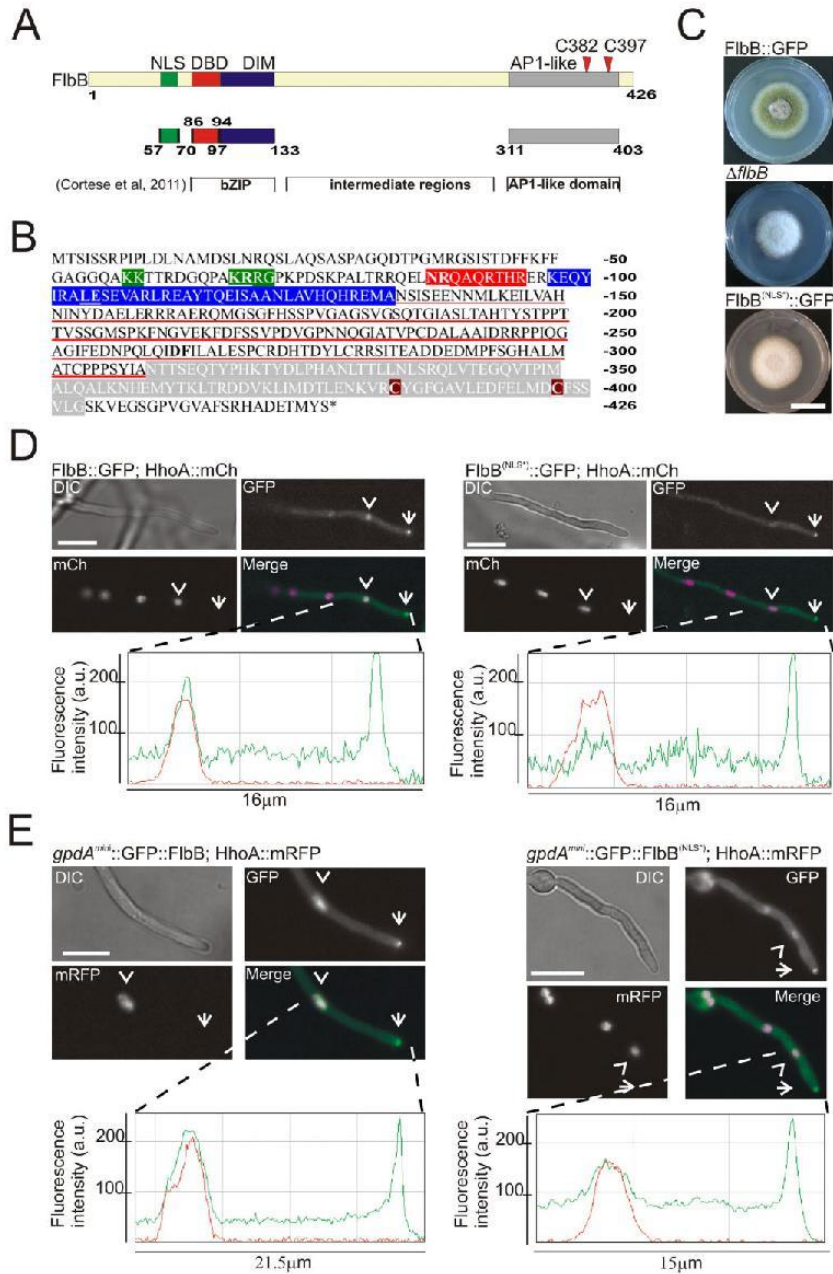


Fig. 2. Defining the NLS in FibB.

A. Domain architecture of FibB. Localization of the FibB domains analyzed in this work along the length of the protein. The three main regions, bZIP, intermediate (red underline) and AP1-like (gray), are indicated. Green color indicates the nuclear localization signal (NLS) domain, red color the DNA binding domains (DBD) and blue color the dimerization (DIM) domain.

B. FibB sequence with the domains and residues analyzed in this work highlighted. Residues mutated to alanines are bold and underlined.

C. Phenotype of FibB::GFP, $\Delta fibB$ and FibB^(NLS*)::GFP strains after 72 h of culture in MMA plates. Scale bar = 2 cm.

D and E. Subcellular localization of GFP-tagged FibB^(NLS*) chimeras, driven either by *fibB⁺* or *gpdA^{mini}* promoters, in strains expressing HhoA::mCherry or HhoA::mRFP chimeras respectively. Scale bar = 5 μ m. Green and red fluorescence intensity plots (arbitrary units) are also shown.

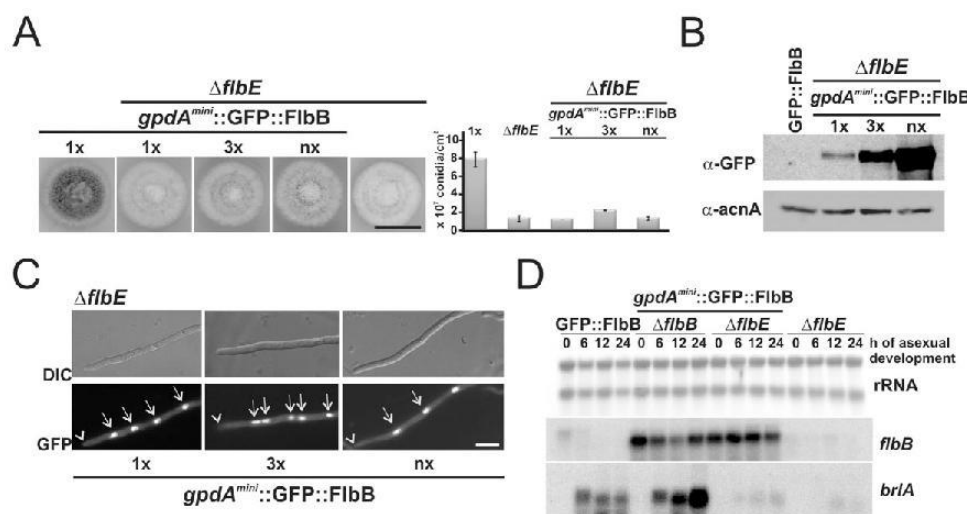


Fig. 3. Effect of *flbE* deletion on FibB localization and activity.

A. Left: Phenotype of $\Delta flbE;gpdA^{mini}::GFP::FibB$ strains, bearing an increasing number of $gpdA^{mini}::GFP::FibB$ copies, compared with the parental $\Delta flbE$ or $gpdA^{mini}::GFP::FibB$ strains. Scale bar = 2 cm. Right: Conidia production per square centimeter by the strains on the left panel. Values are the mean of three replicates plus s.e.m.

B. Western blot assay showing the levels of FibB protein. α -actin was used as loading control.

C. GFP::FibB localization in absence of FibE activity. Arrowheads indicate the cell tip and arrows indicate nuclei. Scale bar = 5 μ m.

D. Northern blot assay showing *flbB* and *brlA* expression levels in $\Delta flbE;gpdA^{mini}::GFP::FibB$ strains. rRNA is used as loading control.

These results are consistent with the participation of residues K67 and R68 in a NLS sequence that targets FibB to nuclei.

Transit of FibB through the tip is a prerequisite for induction of development

The fact that a reduction in nuclear import had no major effect on the apical localization of FibB led us to investigate the effect of constitutive expression of FibB in the absence of its apical partner FibE. $\Delta flbE$ strains carrying one, three and multiple (> 3) copies of the $gpdA^{mini}$ -driven GFP::FibB chimera were generated. Regardless of increasing levels of FibB, colonies of these strains displayed the same aconidial phenotype as the recipient $\Delta flbE$ strain (Fig. 3A and B). To understand the cause of the aconidial phenotype, we investigated the subcellular localization of FibB in these mutant strains. In the absence of FibE, the $gpdA^{mini}$ -overexpressed FibB was found in all nuclei, but it was not detected at the tip of hyphae (Fig. 3C). This change in FibB localization was consistently observed irrespective of the number of copies of the $gpdA^{mini}::gfp::flbB$ construct contained in each strain.

To explain why an increased nuclear pool of FibB did not result in a higher production of conidia, we analyzed the pattern of expression of the major regulator of conidiation, *brlA*. Fig. 3D shows the negligible ability of $gpdA^{mini}$ -

driven FibB to induce *brlA* expression in a null *flbE* background. These outcomes demonstrate that high doses of nuclear FibB cannot rescue the aconidial phenotype caused by the deletion of *flbE*. The loss of apical migration of FibB in this background must fail to generate a transcriptionally active form of the TF.

Improvement of FibB detection by fluorescence microscopy in $gpdA^{mini}$ -driven strains allowed us to update our analysis of the role of the cytoskeleton in FibB dynamics. Our previous studies supported an actin-dependent localization for FibB (Garzia *et al.*, 2009). To confirm this and extend the knowledge of FibB trafficking dynamics, cells from the single $gpdA^{mini}::GFP::FibB$ copy strain were exposed to latrunculin B or benomyl in liquid media following standardized protocols (Arajo-Bazán *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Exposing to latrunculin B caused the loss of FibB apical localization, which could be observed from the first minutes of drug application (Fig. 4A, left). In these conditions, an accumulation of FibB was observed at the subapical region (see the magnifications and surface plots in Fig. 4A). On the other hand, the addition of benomyl did not cause the loss of the apical accumulation of FibB, as previously reported by us (Garzia *et al.*, 2009; Fig. 4A, right). However, the results obtained in medium containing benomyl did not clarify if FibB accumulated at the tip because of being at that location before the addition of the drug. Thus, hyphae of

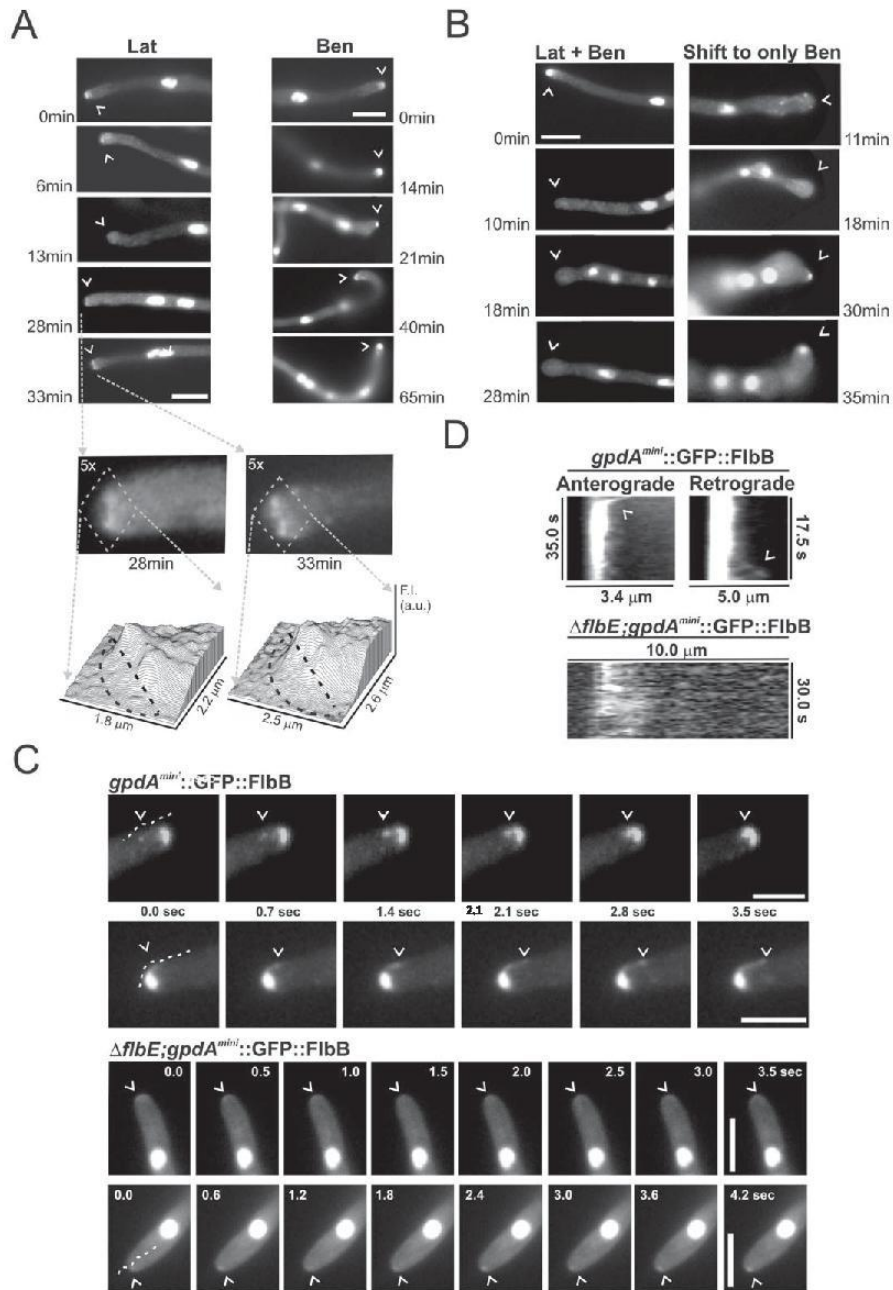


Fig. 4. Role of actin and microtubule cytoskeletons in FliB migration to the apex. A. Localization of a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FliB chimera in MMA containing 100 μ M latrunculin B (left) or 2.4 μ g ml⁻¹ benomyl (right). Magnifications (5 \times) and surface plots show the subapical accumulation of FliB caused by the addition of latrunculin B. Scale bars = 5 μ m. B. GFP::FliB localization in cells of the same strain in medium containing both drugs (left) or after the shift to medium containing only benomyl (right). Scale bar = 5 μ m. C. Stream-image captures showing *gpdA^{mini}*-driven GFP::FliB patches moving in anterograde and retrograde directions in wild-type and Δ *fliE* backgrounds. Arrowheads indicate mobile patches (up) and tips (down). Scale bar in all panels = 5 μ m. The dotted lines indicate the regions analyzed in the kymographs in panel D.

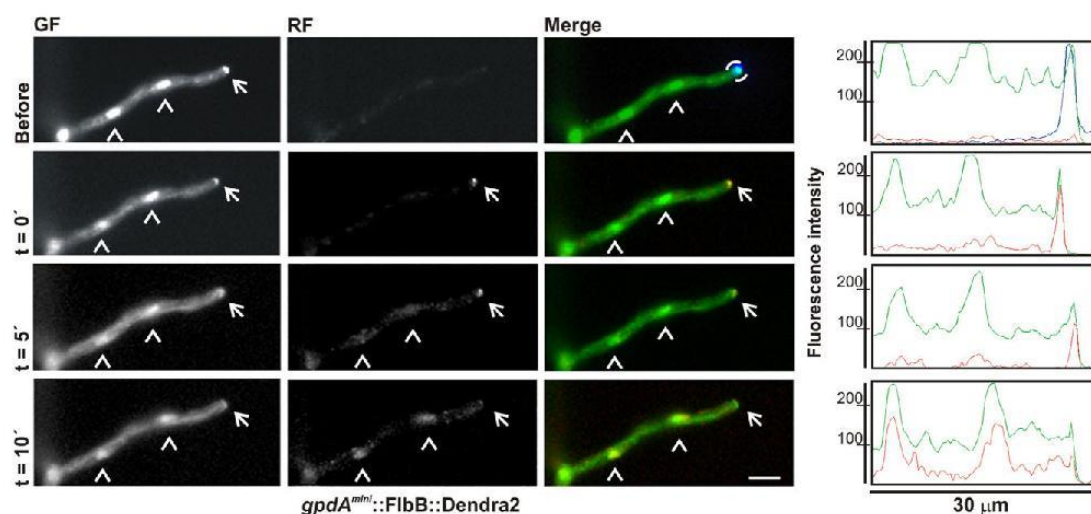


Fig. 5. Retrograde movement of FibB::Dendra2 from the tip to nuclei. Green, red fluorescence and merged images are shown before and at 0, 5 and 10 min after selective photo-conversion of the tip (blue color within the dotted circle in top panel). Plots next to each set of images represent fluorescence intensity (arbitrary units) along the hypha. After photo-conversion, the tip-to-nuclei redistribution of the red fluorescence of FibB::Dendra2 was studied. Photo-conversion was achieved by reducing UV light intensity to 80% of the maximum and using 2500 ms expositions (Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). White arrows and arrowheads indicate the tip and nuclei respectively. Scale bar = 5 μ m (applies to all images).

the same strain were exposed to both drugs simultaneously for 30 min, which caused the loss of apical localization of FibB and a characteristic swelling of the tip (Fig. 4B, left). After that, medium was removed and replaced by one containing only benomyl (Fig. 4B, right). Under these conditions, the restoration of polar extension was accompanied by apical accumulation of FibB. These results suggested that actin filaments are essential for FibB traffic from the subapex to the apex while microtubules seem to play a non-essential role.

Despite the actin dependence of its apical localization, some FibB patches could be tracked in both anterograde and retrograde directions in cells constitutively expressing the GFP::FibB chimera (Fig. 4C; see kymographs in Fig. 4D). However, the movement of FibB was severely inhibited in the $\Delta fibE$ background and no accumulation was visible at the apex over time. Overall, the results described here suggest that the actin-dependent, FibE-mediated presence of FibB at the hyphal tip is a precondition for the acquisition of competency for transcriptional functions in nuclei.

The above results suggested a tip-to-nucleus retrograde movement of FibB. To analyze this possibility, we used a strain expressing a *gpdA^{mini}*-driven chimera of FibB fused to the green-to-red photo-convertible fluorescent protein Dendra2 (Chudakov *et al.*, 2007; Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Green fluorescence was detected at the tip and all nuclei before photo-conversion

while red fluorescence was undetectable (Fig. 5). Then, a diaphragm slider (Carl Zeiss) was used to reduce the field of view and irradiate the tip (blue color within the dotted circle in Fig. 5) to induce the green-to-red conversion of the corresponding Dendra2 pool (Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Photo-conversion conditions allowed the normal maintenance of hyphal growth, a prerequisite for the tip localization of FibB. Finally, the diaphragm was reopened to follow the redistribution of the red fluorescence within the hypha, which corresponds to the photo-converted pool of FibB. After photo-conversion of FibB::Dendra2, red fluorescence was detectable at the tip but not in nuclei ($t = 0$ minutes, Fig. 5). The accumulation of red fluorescence in nuclei 10 min after photo-conversion showed that FibB must migrate from the tip to nuclei in retrograde pattern.

The C-terminal region of FibB is essential for its accumulation at the tip

To identify those regions of FibB mediating its accumulation at the cell apex, we focused on residues 311 to 403 (gray color in Fig. 2A and B). This region shares an elevated sequence similarity with C-terminal regions of AP-1 factors (Cortese *et al.*, 2011), a family of TFs that signal the oxidative state of the cell by moving between the cytoplasm and the nucleus (Castillo *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2013). Strains expressing versions of *fibB^C*-driven

GFP::FlbB truncated at residues 361, 341, 321 or 294 were generated (Fig. S1A and S2A; see also *Experimental procedures*). All truncations caused an aconidial phenotype resembling previously characterized null or loss-of-function *flbB* mutants (Fig. S1B; Etxebeste *et al.*, 2008). None of the truncated GFP::FlbB forms could accumulate at the tip or nuclei (Fig. S1C). Western blot assays showed a sharp decrease of truncated FlbB levels (Fig. S1D), suggesting that low protein concentrations caused the absence of tip accumulation. To avoid this effect, we generated strains bearing multiple copies of the full-length GFP::FlbB or the GFP::FlbB^(1–361) form. The strain expressing multiple copies of GFP::FlbB^(1–361) showed an aconidial phenotype that instead of being the consequence of a decreased FlbB concentration seemed to be caused by the absence of FlbB from the tip (Fig. 6A–C).

Two cysteine residues within the AP1-like C-terminal region of FlbB are also highly conserved among FlbB orthologs (maroon color in Fig. 2A and B). In one analysis, C397 was conserved in orthologs from eutotiales, whereas C382 was more broadly conserved and was present in all 41 FlbB orthologs studied (Cortese *et al.*, 2011). Cysteine residues within the C-terminal end of AP-1 factors play a key role in their conformation, localization and function (Delaunay *et al.*, 2000). Thus, we investigated the role of C382 and C397 in the apical localization of FlbB. Strains expressing GFP-tagged FlbB^(C382A) or FlbB^(C397A) chimeras were generated. Fig. 6D and E show that the ability to conidiate and the localization of FlbB was not altered in the GFP::FlbB^(C397A) mutant, whereas both GFP::FlbB^(C382A) or GFP::FlbB^(C382A;C397A) mutants showed an aconidial phenotype. However, we observed that the loss of apical and nuclear localization caused by the C382A substitution (Fig. 6E) was coincident with a steep decrease in FlbB levels (Fig. 6F). In order to ascertain whether this mutation affected FlbB protein levels, strains bearing one, two or multiple copies of a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FlbB^(C382A) chimera were generated. All strains were aconidial (Fig. 6G) and, despite the increasing protein levels (Fig. 6H), FlbB remained undetected at the tip but accumulated in all nuclei (Fig. 6I). This nuclear pool of FlbB could not induce *brlA* expression (Fig. 6J). Thus, Cys382 play an important role in the retention of FlbB at the tip and the acquisition of its transcriptional regulatory activity (see below).

A predicted dimerization domain within the bZIP of FlbB mediates interaction with FlbE and tip localization

Dimerization domains within bZIPs play key roles in stabilizing regulatory complexes with other bZIP- or non-bZIP-proteins (Schutze *et al.*, 2008), and the nature of the partner usually alters the subcellular localization of the bZIP protein (Sanso *et al.*, 2008; Schutze *et al.*, 2008).

Consequently, we analyzed the function of the predicted dimerization domain of FlbB (DIM; blue color in Fig. 7A). First, we analyzed the ability of GST-tagged full-length or truncated forms of FlbB to retain an FlbB::HA_{3x} chimera in pull-down assays (Fig. 7A and B). GST alone was assayed as negative control. Results showed that a region comprising residues 67–232 was essential for retaining FlbB::HA_{3x}.

Second, we performed a deep bioinformatic analysis of the hypothetical dimerization domain of FlbB and observed that it is quite divergent from prototypical bZIPs. Instead of the 4–5 heptad repeats found in most bZIPs (Vinson *et al.*, 2006) or 3–4 in AP1-like factors, the FlbB DIM domain contains only two. However, the predicted DIM domain of FlbB has several residues in common with the DIM domain of Pap1, the AP-1 ortholog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, including those described to contact the partner monomer (Cortese *et al.*, 2011). Two of the conserved residues in the first heptad of FlbB and Pap1 DIM domains, L104 and E105, were mutated to alanines (underlined and bold in Fig. 2B; we will refer to dimerization mutations as DIM*). A strain expressing *flbB^p*-driven GFP::FlbB^(DIM*) showed an aconidial phenotype, and this was associated to the steep decrease in FlbB levels and the lack of FlbB accumulation in any subcellular compartment (Fig. 7C–E). Because the described decrease in FlbB levels induced by the DIM* mutations masked their effect on the subcellular localization of the TF, a strain expressing a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FlbB^(DIM*) chimera was generated. In this strain, mutant protein FlbB^(DIM*) was detected at nuclei but was excluded from the tip, in agreement with the observed aconidial phenotype (Fig. 7C and E). Pull-down assays indicated that the ability to retain FlbB::HA_{3x} was also strongly affected in the DIM* mutant (Fig. 7F). However, this interaction was mediated by FlbE, as indicated by pull-down assays using crude protein extracts from a $\Delta flbE$; FlbB::HA_{3x} strain (Fig. 7G).

Therefore, the role of the bZIP domain in the interaction with FlbE was analyzed. Pull-down assays were performed using a bacterially expressed GST fused to complete or truncated versions of FlbB (Fig. 8A). GST alone and GST fused to the full-length FlbB^(1–426) protein were assayed as negative and positive controls respectively. The deletion of first 67 amino acids did not affect the interaction between FlbB and FlbE (Fig. 8B, column pair named 67–426). Five additional chimeras bearing successive C-terminal truncations were then tested (Fig. 8A and B), revealing a positive (but apparently weaker) interaction with FlbE when the bZIP domain of FlbB (residues 67–140) was present. The deletion of the bZIP domain caused the loss of interaction with FlbE as shown by the analysis of a truncated FlbB protein comprising residues 115–426 (last column pair in Fig. 8B). These results led us

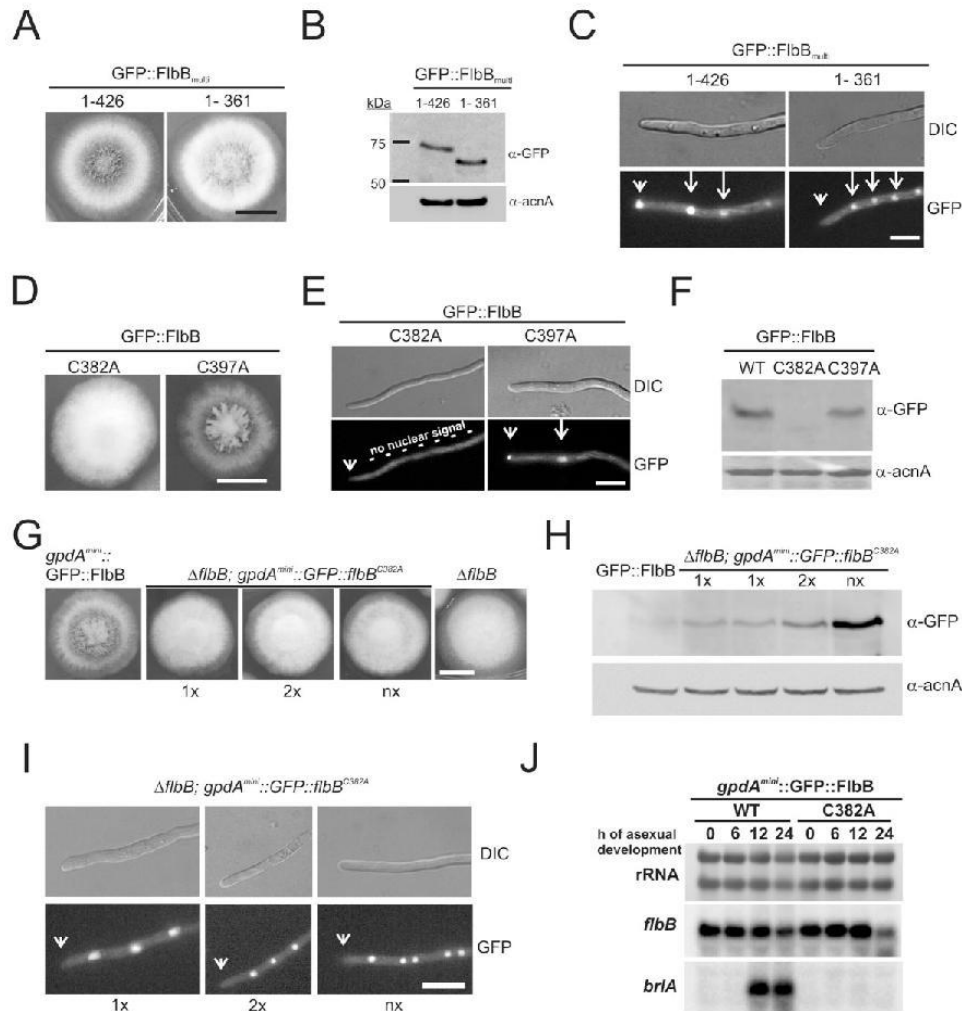


Fig. 6. Characterization of the C-terminal domain of FlbB.

A. Phenotype of strains expressing multiple copies of GFP::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾ and GFP::FlbB⁽¹⁻³⁶¹⁾ chimeras driven by *flbB*⁺, after 48 h of culture at 37°C. Scale bar = 1 cm.

B. Western blot assays showing GFP::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾ and GFP::FlbB⁽¹⁻³⁶¹⁾ levels. α -actin was used as loading control.

C. Subcellular localization of each chimera in vegetative hyphae. Arrowheads indicate tips while arrows indicate nuclei. Scale bar = 5 μ m. See also Fig. S1.

D. Phenotype of strains expressing *flbB*⁺-driven GFP::FlbB^(C382A) or GFP::FlbB^(C397A) mutant chimeras. Scale bar = 1 cm.

E. Subcellular localization of these mutant chimeras in vegetative hyphae. Arrowheads indicate tips and the arrow a nucleus. Scale bar = 5 μ m.

F. Western blot assay showing the levels of the chimeras. α -actin was used as loading control.

G. Phenotype of strains bearing one, two or multiple copies of the *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB^(C382A) plasmid compared with that expressing the wild-type chimera or the Δ *flbB* strain, after 48 h of culture in MMA at 37°C. Scale bar = 1 cm.

H. Western blot assay showing the higher GFP::FlbB^(C382A) levels as the number of copies of the corresponding *gpdA*^{mini} plasmid increase. Anti-actin, α -actin, was used as loading control.

I. Subcellular localization of *gpdA*^{mini}-driven GFP::FlbB^(C382A) chimeras in the strains shown in panel D. Arrowheads indicate the absence of the C382A mutant from the tip of vegetative hyphae. Scale bar = 5 μ m.

J. Northern blot assay showing *flbB* and *briA* expression levels in *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB and *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB^(C382A) strains at the vegetative stage and 6, 12 or 24 h after the induction of conidiation. rRNA is used as loading control.

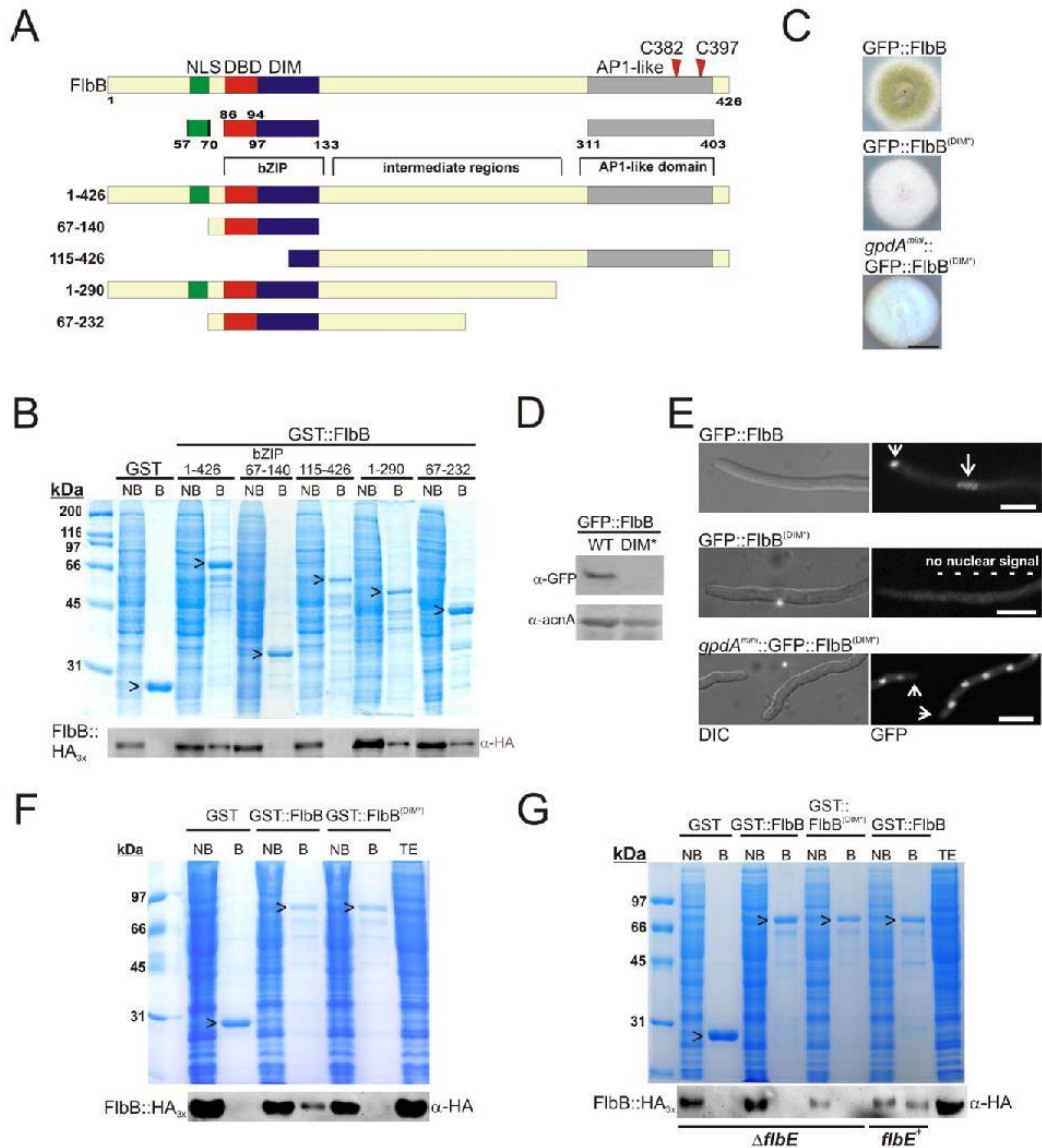


Fig. 7. Role of the dimerization domain in the accumulation of FlbB at the tip. A. Representation of the truncated GST-tagged FlbB forms generated. Residues comprising each of the truncated proteins are indicated on the right side. B. Pull-down assays using as bait the truncated forms shown in A (gels stained with Coomassie blue) and total protein extracts from a strain expressing a *flbB*-driven FlbB::HA_{3x} chimera (Western blots below). NB, non-bound fraction; B, bound fraction. C. Phenotype of strains expressing *flbB*-driven GFP::FlbB, GFP::FlbB^(DIM+), or *gpdA^{mini}*-driven GFP::FlbB^(DIM+) chimeras after 48 hours of culture at 37°C in MMA. Scale bar = 1 cm. D. The GFP::FlbB^(DIM+) chimera, expressed by *flbB*, is hardly detectable in Western blotting. α -actin was used as loading control. E. Subcellular localization of GFP-tagged FlbB^(DIM+) chimeras, driven either by *flbB* or *gpdA^{mini}*. Arrowheads indicate tips and arrows nuclei respectively. Scale bar = 5 μ m. F and G. Pull-down assay using GST, GST::FlbB or GST::FlbB^(DIM+) fusions as bait (arrowheads on the gel stained with Coomassie blue) and total protein extracts from strains expressing a *flbB*-driven FlbB::HA_{3x} chimera in a wild-type or Δ *flbE* backgrounds respectively. NB, non-bound fraction; B, bound fraction.

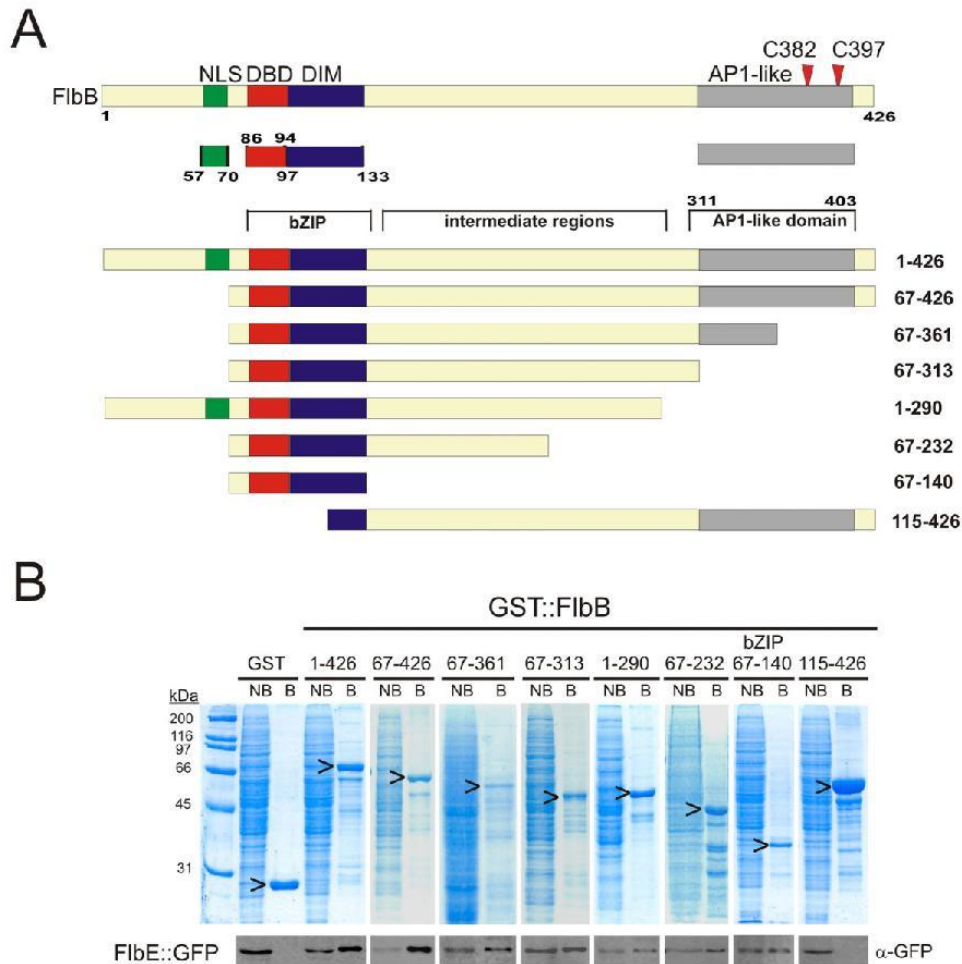


Fig. 8. The bZIP domain of FibB is essential for the interaction with FibE.

A. Representation of the truncated GST-tagged FibB forms used in this experiment. Residues comprising each of the truncated proteins are indicated on the right side.

B. Pull-down assays using as bait the truncated forms shown in A (gels stained with Coomassie blue) and total protein extracts from a strain expressing an *fibE*⁻-driven FibE::GFP chimera (Western blots below). NB, non-bound fraction; B, bound fraction.

to conclude that the bZIP domain of FibB is essential for the *in vitro* interaction with FibE.

We then focused on amino acids L104 and E105 within the dimerization domain and C382 within the C-terminal domain. The remarkably low solubility of the GST::FibB^(C382A) chimera (see Fig. S3A and S3B) suggested the formation of inclusion bodies, which could be the consequence of folding defects caused by the substitution of the cysteine residue by an alanine (see *Discussion*). DTT (5 mM) was used to improve its binding to the glutathione sepharose resin (Fig. S3C). Then, we proceeded with the pull-down assays (Fig. 9A, left). Results

showed that DIM* mutations strongly inhibited the interaction between GST::FibB and FibE::GFP. This effect was more clearly observed when the expression of the FibE::GFP chimera was driven by the *gpdA*^{mini} promoter, which increased FibE::GFP concentration and the stability of the FibB/FibE complex (Fig. 9A; right). Due to the low quantities of GST::FibB^(C382A) bound to the resin, we quantified the ratio between Western blot and Coomassie band intensity and observed that the C382A substitution had a measurable effect in the amount of FibE::GFP retained but lower than that of the DIM* mutations (Fig. 9A and B). Fluorescence microscopy analyses of FibE::GFP in strains

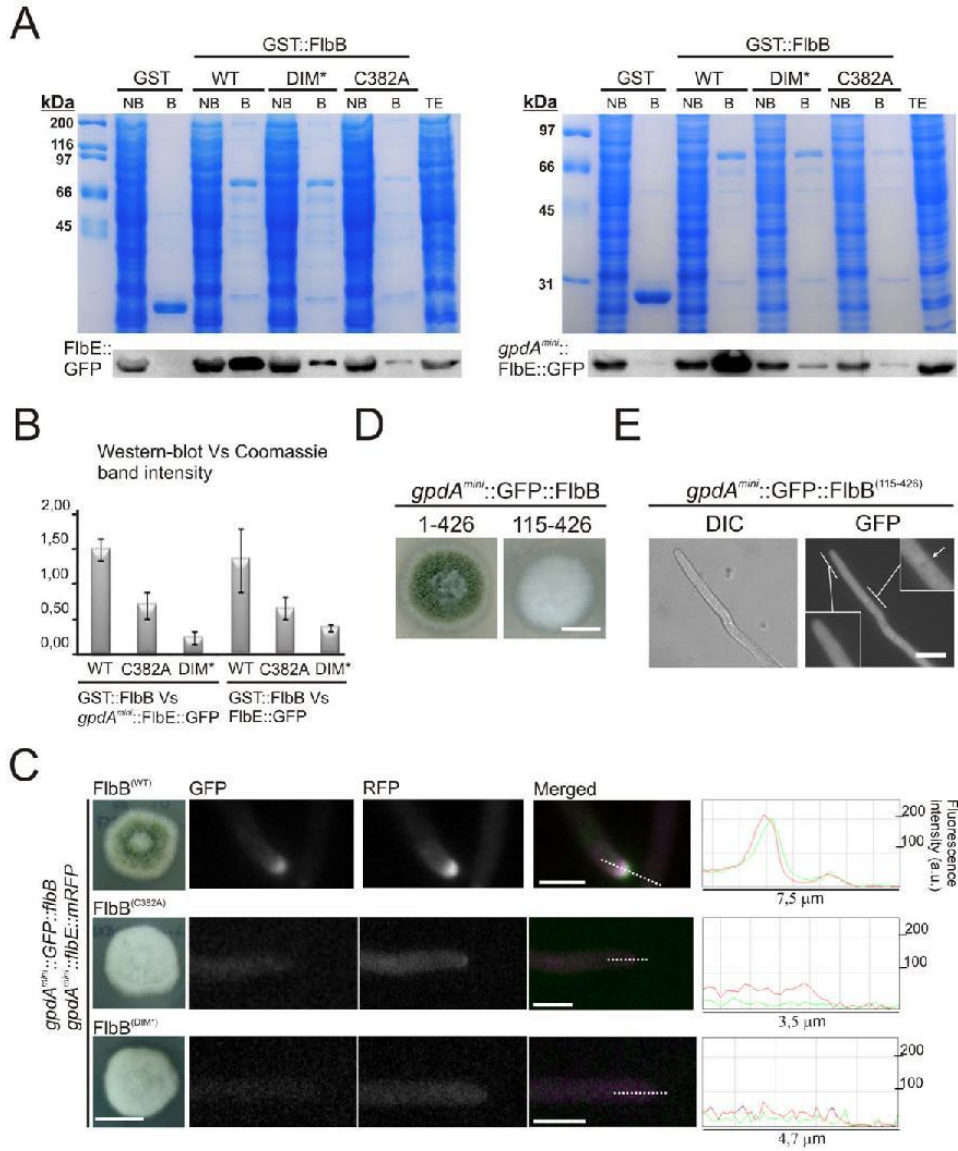


Fig. 9. Interaction between FibE and FibB is affected by the lack of residues L104 and E105 or C382. **A.** Pull-down assays using as bait GST alone, or GST::FibB, GST::FibB^(DIM*) or GST::FibB^(C382A) chimeras and total protein extracts from strains expressing a *fibE*⁺ (left) or a *gpdA^{mini}*-driven (right) FibE::GFP chimera. **B.** A graph representing the ratios between Western blot and Coomassie band intensity for the replicates of the pull-down assays in panel A (right). **C.** Left: Phenotype of *gpdA^{mini}::FibE::mRFP* strains in *gpdA^{mini}::GFP::FibB*, *gpdA^{mini}::GFP::FibB^(C382A)* or *gpdA^{mini}::GFP::FibB^(DIM*)* backgrounds after 72 h of culture at 37°C in MMA. Scale bar = 2 cm. Right: Subcellular localization of FibE::mRFP and GFP::FibB, GFP::FibB^(C382A) or GFP::FibB^(DIM*) chimeras in vegetative hyphae of the corresponding strains. Scale bar = 5 μm. Green and red fluorescence intensity plots (arbitrary units) are also shown. **D.** Phenotype of strains expressing full-length or N-terminally truncated (115–426) chimeras of GFP::FibB, driven by the *gpdA^{mini}* promoter. Scale bar = 1 cm. **E.** Subcellular localization of the *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾ chimera. Insets show magnifications of regions corresponding to the tip and the apical nucleus. Arrow probably indicates a nucleolus. Scale bar: 5 μm.

expressing *gpdA^{mini}*-driven WT, C382A or DIM* forms of GFP::FibB showed that both mutations inhibited the apical accumulation of FibE (Fig. 9C). Taking these results into consideration, we propose that both the dimerization and the AP1-like C-terminal domains are essential for the interdependent apical localization of FibB and FibE (Garzia *et al.*, 2009). The dimerization domain mediates the interaction with FibE, whereas Cys382 could be important for a critical aspect of folding of FibB that strengthens the binding (see *Discussion*).

To corroborate *in vivo* the significance of the N-terminal region of FibB, which included the NLS and bZIP domains, a strain expressing a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾ chimera as the unique source of FibB was generated. As expected, the lack of these two domains caused a complete loss-of-function of FibB and, thus, an aconidial phenotype (Fig. 9D). A fluorescence microscopy analysis showed that, though its expression was driven by *gpdA^{mini}*, GFP::FibB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾ did not accumulate at the tip of the hypha or at nuclei (Fig. 9E). The fluorescent chimera displayed a dispersed distribution along the cytoplasm of the sycytium.

This study highlights the complexity of the UDA signaling pathway, in which diverse domains and motifs of FibB modulate, possibly in a concerted manner, its subcellular localization, the formation of an apical complex with FibE, targeting of the protein to the nucleus and the subsequent transcriptional activation of asexual reproduction.

Discussion

The tips of vegetative hyphae are the first part of the fungal mycelium to colonize new environments. Consequently, and in addition to sustaining growth, tips should also include mechanisms for environmental sensing and signal transduction (Harris, 2009). Recent studies have described that, in response to environmental stimuli, specific kinases migrate from the tip to nuclei where they activate sexual development or effector production during host invasion (Bayram *et al.*, 2012; Bielska *et al.*, 2014). In permanently polarized cells such as neurons, synaptic TFs act as conveyors of injury signals and activators of the regeneration response in the nucleus (Hanz *et al.*, 2003; Panayotis *et al.*, 2015). The translocation mechanism of these TFs typically include MAPK signaling as well as the participation of importins α and β , the latter being locally translated, and molecular motors such as dynein (Rishal and Fainzilber, 2014). Our results show that TF-mediated, direct tip-to-nucleus communication also occurs in filamentous fungi, with the bZIP TF FibB purportedly relaying a sensed environmental signal from the tip to the nuclei (Etxebeste *et al.*, 2010) and there acting as a key regulator of conidia production. In a context in which conidia constitute the main mechanism

for the spread of filamentous fungal pathogens, FibB arises as the first known model of an apical TF mediating fungal development.

FibB accumulates at the tip of hyphae at the very beginning of germ-tube formation and continues in this location as long as polarized cell growth is maintained (Etxebeste *et al.*, 2009; Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Actin filaments play a central role in the transport of FibB from the subapex to the apex, whereas the microtubule cytoskeleton seems not to be essential for the apical accumulation (number 1 in Fig. 10). The presence of FibB at the tip does not simply respond to a need for retention outside the nuclei. As observed in some *fibB* mutants and the null *fibE* background, FibB must first pass through the pool at the tip in order to gain competence for its activating function at the nucleus. We uncovered two main requirements for the activation of FibB at the tip. First, the bZIP domain enables the formation of heterodimers with FibE, underlining the tight functional relationship between FibB and FibE. The absence of FibE disrupts the accumulation of FibB at the tip as evidenced by the lack of movement of its patches (Fig. 4). Thus, it is tempting to suggest that both proteins move jointly to the tip and that FibE may act as a linker for connecting FibB to the corresponding transport mechanism. A key future landmark in the study of the control of developmental induction will be the determination of the role of FibE domains and the identification of those mediating the interaction with FibB. An additional intriguing question for the future is whether anterograde FibB patches mark a specific subpopulation of vesicles or constitute protein aggregates (1a and 1b, respectively, in Fig. 10). As membrane trafficking has been shown to be intricately connected to mRNA transport (Jansen *et al.*, 2014), a possible polarized localization of the mRNA of *fibB* should also be tested.

The second requirement involves an intact C-terminal region of FibB. This observation emphasizes the importance of the cysteine in position 382 as a second element mediating the apical localization of the FibB/FibE complex. The absence of Cys residues in FibE precludes a role of Cys382 in the formation of disulfide bridges between FibB and FibE. Thus, the improvement in the FibB/FibE interaction attributed to Cys382 could be the consequence of allowing the formation of appropriate intra- or intermolecular interactions enabling proper folding of FibB and/or association with protein or lipid structures in the apical compartment. Alternatively, it could constitute a mechanism for hiding the NLS similarly to the mechanism that retains Pap1 in the cytoplasm (Kudo *et al.*, 1999; Kuge *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2002).

A nuclear export signal (NES) contributes to the accumulation of Pap1 in the cytoplasm. Our bioinformatic analyses identified a domain in the C-terminal region of FibB, comprising amino acids 385 to 394, showing imper-

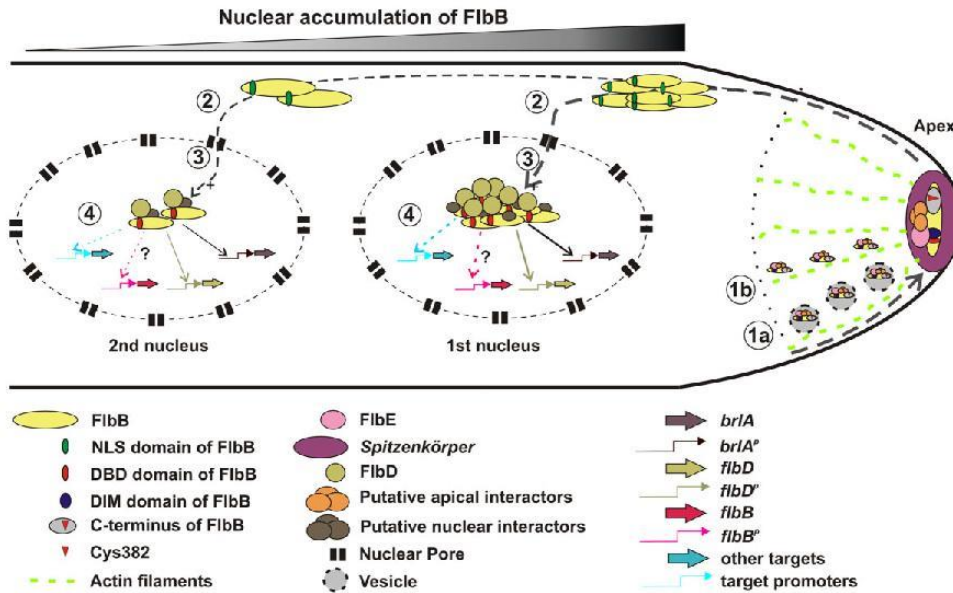


Fig. 10. A model depicting the relationship between apical and nuclear pools of FibB. A. Actin filament-dependent accumulation of FibB at the tip of vegetative hyphae through the dimerization motif and the C-terminal region. 1a and 1b indicate transport in vesicles or as protein aggregates respectively. B. Targeting of FibB to the nucleus. C. Import of FibB through the nuclear pore. D. Transcriptional regulation by FibB, binding directly to *flbD* and *brlA* promoters (arrows). FibB is also necessary to maintain its own expression and/or protein levels and induce the expression of *urdA*, coding for a putative HLH transcription factor involved in the repression of sexual development.

fect matches to the classical NES consensus sequence (La Cour *et al.*, 2003). Nevertheless, alanine substitution of hydrophobic amino acids F392 and E393 did not affect the localization of *flbB^o*-driven GFP::FibB^(F392A;E393A) or FibB::GFP^(F392A;E393A) chimeras nor conidia production (not shown). Along with the absence of nuclear exclusion for the GFP::FibB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾ form, these results suggest that the existence of a NES within FibB is unlikely. Focusing on the biochemistry of the apical complex and its hypothetical association with subcellular structures at the tip of the cell can further elucidate the role of the AP1-like domain of FibB.

The need of an apical accumulation of FibB and the tip-to-nuclei directionality of its movement helps explain the important issue of how the asymmetric nuclear distribution is generated (numbers 2 and 3 in Fig. 10). Because nuclear transporters distribute regularly in nuclei of vegetative hyphae (Markina-I arrairaequi *et al.*, 2011), the asymmetry might not be generated by a hypothetical uneven cellular distribution of the corresponding import machinery along the syncytium. Our results strongly suggest that the restricted space at the tip would limit the number of FibB molecules that could be activated there,

thus limiting the quantity available for nuclear uptake. Assuming that this pool would not saturate the nuclear import machinery, the retrograde migration of transcriptionally active FibB would result in the first nucleus receiving the greatest number of molecules, thus generating the asymmetry. Constitutive expression of FibB masked this asymmetry by overdriving the mass action effect.

Nuclear import of proteins requires the presence of an NLS within the cargo and its recognition by a karyopherin. We have delimited residues K57 and K72 as parts of a bipartite NLS mediating the nuclear accumulation of FibB. Importin- α and β 1 constitute the main nuclear transport complex in eukaryotes, importin- α being the adapter that links the cargo with the actual importer, importin- β 1 (Gorlich and Kutay, 1999). As consensus bipartite NLSs are recognized by importin- α and considering that *A. nidulans* importin- α and - β homologs, KapA and KapB, move anterogradely to reach the tip of hyphae (Etxebeste *et al.*, 2013), we studied the phenotype of a FibB::GFP strain expressing the only temperature sensitive (*ts*) allele of *kapA* available, *kapA31* (Araujo-Bazan *et al.*, 2009). Strains expressing *ts* alleles of *kapB* are unfortunately not available. The *kapA31* strain showed a clearly visible acco-

nidial phenotype at the restrictive temperature of 37°C (Fig. S4). However, our attempts to demonstrate an interaction between KapA and FlbB through yeast two-hybrid assays have hitherto been unsuccessful. This suggests that the aconidial phenotype observed for the *kapA31* strain could be due to an absence of nuclear accumulation of another regulator of development, as has been demonstrated with VeA (Araujo-Bazan *et al.*, 2009). The possibility of other karyopherins mediating the tip-into-nucleus transport of FlbB is open but the functional characterization of karyopherins in filamentous fungal cells identified KapA and KapB as the only ones with a detectable long-distance cytoplasmic movement within hyphae (Markina-I arrairaequi *et al.*, 2011; Etxebeste *et al.*, 2013).

The transcriptional activity of FlbB extends beyond the induction of *flbD* and *brlA* expression (number 4 in Fig. 10; Garzia *et al.*, 2010). On the one hand, the fact that specific mutations within *flbB* triggered a marked decrease in protein levels suggests that *flbB* expression and/or FlbB concentration are dependent on FlbB activity. On the other hand, RNA sequencing experiments identified transcriptional targets of FlbB such as *urdA*, which codes for a putative TF that acts upstream of *brlA* and serves to repress mis-scheduled induction of fruiting-body formation (Oartzabal-Arano *et al.*, 2015).

Overall, the succession of events summarized in Fig. 10 illustrates various roles of FlbB motifs and residues in its accumulation at the tip, its subsequent activation there, its nuclear import and the regulation of its target genes. Being the first TF known to mediate the tip-to-nucleus communication in filamentous fungi, this model establishes a general framework for future analyses to elucidate the molecular mechanisms employed by UDAs for coupling apical sensing with transcriptional control. The knowledge generated could make major contributions to the development of advanced strategies for the containment of mycoses caused by filamentous fungi.

Experimental procedures

Oligonucleotides, plasmids, strains and culture conditions

Oligonucleotides and *A. nidulans* strains used in this work are shown in Tables S1 and S2 respectively. Strains were cultivated in appropriately supplemented liquid or solid standard minimal (MMA) or complete (MCA) medium (Cove, 1966).

The usefulness of the *gpdA^{mini}* promoter (Pantazopoulou and Pe alva, 2009) for the constitutive expression of *flbB* had previously been verified by us (Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Construction of *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* plasmid was based on *gpd003* (Fig. S5; Pantazopoulou and Pe alva, 2009). First, a *Bam*HI-*Bam*HI sequence from plasmid p1155 [*palcA⁺::GFP::PacC*(5–250); (Mingot *et al.*, 2001)], encoding GFP, was cloned into a pGEX::FlbB plasmid (see below). Correct orientation of GFP fused to the FlbB

N-terminus was confirmed, and the fragment encoding GFP::FlbB was extracted using *Nco*I-*Eco*RI enzymes. The ligation of this fragment into *gpd003* generated the plasmid *gpdA^{mini}::GFP::FlbB*, which was used as template to introduce point mutations within FlbB. Oligonucleotides used in the mutagenic-PCR reactions are shown in Table S1, and the procedure followed to select mutant plasmids is shown in Fig. S5. Genomic integration of WT or mutant *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* plasmids was directed at the *pyroA* locus of protoplasts from strains BD177 (Δ *flbB*) or BD178 (Δ *flbE*). Recombinant strains were selected based on the *pyroA⁺* phenotype and Southern blot technique.

To generate mutant GFP::FlbB strains, plasmid pBSK-*pyroA⁺::GFP::FlbB* was constructed as follows. An *flbB⁺::gfp::flbB::3'-UTR* DNA cassette was amplified by PCR using genomic DNA from strain BD185 as template and oligonucleotides *flbBmutag+1* and *flbBmutag-1*, which included *Asp*718 restriction sites (Fig. S2A). The insert was ligated into a pBSK-*pyroA⁺* plasmid (Garzia *et al.*, 2009) to generate the recombinant pBSK-*pyroA⁺::GFP::FlbB* plasmid. This template was mutagenized by PCR to introduce stop codons or point mutations within the *flbB* sequence (Table S1). Mutant plasmids were sequenced to confirm the presence of the required mutation. WT or mutant pBSK-*pyroA⁺::GFP::FlbB* plasmids were then used as template to amplify, with oligonucleotides *flbB-PP1* and *flbB-GSP4*, *flbB⁺::gfp::flbB⁺::3'-UTR* DNA cassettes, which bore no genetic marker. These cassettes were then used to transform protoplasts of strain BD143 (Δ *flbB::pyrG^{Atum}*). Genomic integration was directed at the *flbB* locus, and the selection of transformants was done using 2 mg ml⁻¹ of 5-fluoroorotic acid (FOA; Apollo Scientific, UK) in culture medium. Homologous recombination was confirmed by Southern blot.

To generate mutant FlbB::GFP strains, three different PCR products were amplified, fused and used to transform protoplasts of a WT strain (Yang *et al.*, 2004; Fig. S2B): (i) a 1.5 kb fragment bearing the 3'-coding region of *flbB* (oligonucleotides *flbB-GSP1* and *flbB-GSP2* and mutant pBSK-*pyroA⁺::GFP-FlbB⁺* plasmids as template); (ii) *gfp::pyrG^{Atum}*, bearing complementary tails to the other two PCR products (oligonucleotides *flbB-GFP1* and *flbB-GFP2* and plasmid pFN03 as template); and (iii) the 3'-UTR region of *flbB* (oligonucleotides *flbB-GSP3* and *flbB-GSP4* and genomic DNA from *A. nidulans* as template).

Protoplasts from strains expressing WT FlbB or FlbB forms bearing point mutations within its NLS were transformed with fusion-PCR cassettes bearing a mCherry- or mRFP-tagged Histone-H1-coding gene *hhoA* (Markina-I arrairaequi *et al.*, 2011).

Spore production by colonies grown on solid medium was calculated as described by Garzia *et al.* (2010), using three replicates for each strain. Statistical analyses to compare different conditions were based on the two-tailed Student's *t*-test for unpaired samples.

Microscopy

Aspergillus nidulans conidiospores were inoculated in supplemented watch minimal medium (WMM; Pe alva, 2005) and incubated for 18 h at 25°C. The association of FlbB localization to different cytoskeletal networks was analyzed

essentially as described in Arajo-Bazan *et al.* (2008), using 100 μM Latrunculin B (Calbiochem) and/or 2.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Benomyl (Aldrich) concentrations. Cultures were observed as previously described using a Leica DMI-6000b or a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscopes (Hernandez-Ortiz and Espeso, 2013; Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Images were acquired after 200, 100 or 50 ms of exposure times for strains carrying a single, double or multiple copies of the *pgpdA^{mini}::GFP::FibB* vector respectively. Images for *GFP::FibB* and *FibB::GFP* strains were obtained with 800 ms exposure times. The Axio Observer microscope included a diaphragm slider for the selective irradiation of the tip and 500–1000 ms exposures were used to detect green or red signals of *FibB::Dendra2* respectively (Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Fluorescence levels were measured using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij>) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Protein extraction and Western blot analyses

Protein extraction was carried out as described in Fernandez-Martinez *et al.* (2003). Proteins were separated in standard 10% SDS-polyacrylamide gels before electrotransfer to nitrocellulose filters. GFP-tagged proteins were detected with anti-GFP mouse monoclonal antibody cocktail (1/5000; Roche). Actin, used as loading control, was detected using mouse anti-actin antibody (1/50 000; ICN Biomedicals). Peroxidase conjugated anti-mouse (1/4000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) was used as secondary antibody. Peroxidase activity was detected with Amersham Biosciences ECL kit, and chemiluminescence was detected using a Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm Life Science) or a Chemidoc + XRS system (Bio-Rad).

Expression of recombinant proteins in bacteria

Plasmid pGEX-2T (Pharmacia) was used to express fusions of GST to full, truncated or point-mutant versions of FibB. Using standard PCR, the cDNA of *fibB* (Etxebeste *et al.*, 2008) was amplified (oligonucleotides GST-FibB 1 and GST-FibB 2; Fig.S3) and cloned into pGEX-2T to render plasmid pGEX::FibB. Similarly, truncated versions of FibB were PCR amplified using pGEX::FibB as template and the corresponding oligonucleotide pairs (Table S1), and cloned into pGEX-2T. *E. coli DH1* strains transformed with each vector were grown until $\text{OD}_{600} = 0.6\text{--}0.8$, and expression of GST-tagged proteins was induced with the addition of 0.1 mM IPTG and further incubation at 15°C for 24 h. Cultures were centrifuged, and bacterial pellets were subsequently re-suspended in PBS (150 mM NaCl, 200 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaH_2PO_4) supplemented with a complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche). Cells were lysed using a French press at 1200 psi or sonication (8 pulses of 30 s plus additional 30 s on ice), and the supernatant generated after centrifugation was saved for further uses.

Pull-down assays

Protein–protein interactions were assayed using the above-mentioned GST-tagged FibB chimeras and total *A. nidulans*

protein extracts. GST-tagged proteins were attached to glutathione sepharose media (GE Healthcare) after 1 h incubation at 4°C. After three washing steps with PBS plus protease inhibitors, 2 mg of the total protein extract from the corresponding *A. nidulans* strain were added to the tube. A second incubation at 4°C for 1 h was performed to allow the interaction. After three to five washing steps, resin was re-suspended in loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecylsulfate, 5% β -mercaptoethanol, 6 M urea, 0.05% bromophenol blue) and proteins in samples denatured before being electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels. Proteins were visualized with the Bio-Safe Coomassie stain (Bio-Rad), and tagged proteins were specifically detected by Western blotting.

RNA isolation and Northern blot analyses

Isolation of total RNA and Northern blot analyses were carried out as previously described (Garzia *et al.*, 2009). Radioactive signals were detected using a BAS-MS 2040 imaging plate (FujiFilm) and a Phosphorimager FLA-3000 (FujiFilm).

Bioinformatic analyses

Alignments of putative FibB domains were performed with ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). The NLStradamus algorithm (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) was used for NLS prediction.

Acknowledgements

This work has been supported by the Basque Government through grant IT599-13 to U.U., as well as by the Ministerio de Economía y Competitividad (formerly Ministerio de Ciencia e Innovación) through grant BFU2010-17528 to U.U. and grant BFU2012-33142 to E.A.E. E.H.-G., E.O.-A and E.P.-A held predoctoral fellowships from the Basque Government or the University of The Basque Country. O.E was a contract researcher associated to grant BFU2010-17528 and is now a lecturer at the University of The Basque Country. A.M.-I. is a postdoctoral researcher associated to grant IT599-13. Technical support provided by Dr. Ricardo Andrade, from the SGIker microscopy service at the UPV/EHU, and Ivan González, from Carl Zeiss Microscopy, is gratefully acknowledged.

References

- Adams, T.H., Boylan, M.T., and Timberlake, W.E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353–362.
- Arajo-Bazan, L., Pealva, M.A., and Espeso, E.A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67**: 891–905.
- Araujo-Bazan, L., Dhingra, S., Chu, J., Fernandez-Martinez, J., Calvo, A.M., and Espeso, E.A. (2009) Importin alpha is

- an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**: 506–515.
- Bayram, O., Bayram, O.S., Ahmed, Y.L., Maruyama, J., Valerius, O., Rizzoli, S.O., *et al.* (2012) The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet* **8**: e1002816.
- Ben-Yaakov, K., Dagan, S.Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalanchi, D., Willis, D.E., *et al.* (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* **31**: 1350–1363.
- Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J., and Steinberg, G. (2014) Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**: 5097.
- Calvo, I.A., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2013) Reversible thiol oxidation in the H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1. *J Cell Sci* **126**: 2279–2284.
- Castillo, E.A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., *et al.* (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* **45**: 243–254.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2007) Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* **42**: 553, 555, 557.
- Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS ONE* **6**: e17505.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51–56.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., and Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157–5166.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., *et al.* (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**: 38–48.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Arajo-Bazan, L., Rodriguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2009) The bZip-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73**: 775–789.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569–576.
- Etxebeste, O., Villarino, M., Markina-Inarrairaegui, A., Araujo-Bazan, L., and Espeso, E.A. (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *PLoS ONE* **8**: e85076.
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr, Penalva, M.A., and Espeso, E.A. (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* **334**: 667–684.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I., and Kobe, B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J Biol Chem* **278**: 27981–27987.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172–184.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314–1324.
- Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2001) A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *J Theor Biol* **208**: 151–164.
- Gorlich, D., and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607–660.
- Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.Q., Massarwa, R., Huerta, J.J., *et al.* (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* **40**: 1095–1104.
- Harris, S.D. (2009) The Spitzenkörper: a signalling hub for the control of fungal development? *Mol Microbiol* **73**: 733–736.
- Hernandez-Ortiz, P., and Espeso, E.A. (2013) Phosphoregulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **89**: 532–551.
- Jansen, R.P., Niessing, D., Baumann, S., and Feldbrugge, M. (2014) mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet* **30**: 408–417.
- Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* **274**: 15151–15158.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., and Nomoto, A. (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**: 6139–6150.
- La Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F.M., and Brunak, S. (2003) NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* **31**: 393–396.
- Li, R., and Gundersen, G.G. (2008) Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 860–873.
- Markina-Inarrairaegui, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Arajo-Bazan, L., Fernandez-Martinez, J., Flores, J.A., *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **22**: 3874–3886.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Diez, E., and Penalva, M.A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* **21**: 1688–1699.
- Oiartzabal-Arango, E., Garzia, A., Gorostidi, A., Ugalde, U., Espeso, E.A., and Etxebeste, O. (2015) Beyond asexual development: modifications in the gene expression profile caused by the absence of the *Aspergillus nidulans* transcription factor FlbB. *Genetics* **199**: 1127–1142.

- Panayotis, N., Karpova, A., Kreutz, M.R., and Fainzilber, M. (2015) Macromolecular transport in synapse to nucleus communication. *Trends Neurosci* **38**: 108–116.
- Pantazopoulou, A., and Pe alva, M.A. (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**: 4335–4347.
- Penalva, M.A. (2015) A lipid-managing program maintains a stout Spitzenkorper. *Mol Microbiol* **97**: 1–6.
- Pe alva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963–975.
- Perez-de-Nanclares-Arregi, E., and Etxebeste, O. (2014) Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **70**: 33–41.
- Riquelme, M. (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**: 587–609.
- Rishal, I., and Fainzilber, M. (2014) Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **15**: 32–42.
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C., and Hidalgo, E. (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot Cell* **7**: 826–835.
- Schutze, K., Harter, K., and Chaban, C. (2008) Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Sci* **13**: 247–255.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Ara jo-Baz n, L., Dou, X., Espeso, E.A., Pe alva, M.A., et al. (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 1439–1449.
- Takeshita, N., Manck, R., Grun, N., de Vega, S.H., and Fischer, R. (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**: 34–41.
- Upadhyay, S., and Shaw, B.D. (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68**: 690–705.
- Vinson, C., Acharya, A., and Taparowsky, E.J. (2006) Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 4–12.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P., et al. (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359–1362.
- Yu, J.H., Mah, J.H., and Seo, J.A. (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryot Cell* **5**: 1577–1584.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.



REVIEW

Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*

Elixabet Oiartzabal-Arano¹ · Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi¹ ·
Eduardo A. Espeso² · Oier Etxebeste¹Received: 1 December 2015 / Revised: 11 December 2015 / Accepted: 12 December 2015 / Published online: 18 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The infection cycle of filamentous fungi consists of two main stages: invasion (growth) and dispersion (development). After the deposition of a spore on a host, germination, polar extension and branching of vegetative cells called hyphae allow a fast and efficient invasion. Under suboptimal conditions, genetic reprogramming of hyphae results in the generation of asexual spores, allowing dissemination to new hosts and the beginning of a new infection cycle. In the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, asexual development or conidiation is induced by the upstream developmental activation (UDA) pathway. UDA proteins transduce signals from the tip, the polarity site of hyphae, to nuclei, where developmental programs are transcriptionally activated. The present review summarizes the current knowledge on this tip-to-nucleus communication mechanism, emphasizing its dependence on hyphal polarity. Future approaches to the topic will also be suggested, as stimulating elements contributing to the understanding of how apical signals are coupled with the transcriptional control of development and pathogenesis in filamentous fungi.

Keywords Filamentous fungi · Polar growth · Asexual reproduction · Conidiation · Upstream developmental activation · Central developmental pathway

Introduction: Life-cycle characteristics behind the impact of filamentous fungi

Filamentous fungi are widely used in industry and medicine as a source of enzymes, antibiotics or immunosuppressants (Gutierrez-Correa et al. 2012). However, they constitute one of the most threatening groups of fungal pathogens, severely affecting animal and plant species as well as the production and quality of grain and fruits (Bebber et al. 2013; Fisher et al. 2012). Filamentous fungi grow fast and efficiently on a variety of substrates and their genomes also encode information for disseminating and responding to environmental perturbations (Adams et al. 1998).

The cell type that best represents these traits is the vegetative hypha. After its deposition on a substrate and a period of isotropic growth, a spore from the model fungus *Aspergillus nidulans* establishes a polarity site and germinates (Fig. 1a). Spore germination is subjected to environmental determinants such as light, conidial density or the presence of 8-carbon oxylipins (Braga et al. 2015; Herrero-Garcia et al. 2011; Rohrig et al. 2013). Spore germination and germ-tube extension generate syncytial (multinucleated) and cylindrical cells with a slightly tapered apex. Hyphae are continuously polarized and apical extension is mediated by the addition of new plasmatic membrane and cell-wall materials that are transported from distal regions to the sub-apex on microtubules and then to the apex on actin tracks (Riquelme 2013; Takeshita et al. 2014). Hyphal growth and branching generate a complex network of interconnected cells called mycelium, which constitutes the main structure

Communicated by M. Kupiec.

E. Oiartzabal-Arano and E. Perez-de-Nanclares-Arregi contributed equally.

✉ Oier Etxebeste
oier.echeveste@ehu.eus¹ Biochemistry II Laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country (UPV/EHU), Manuel de Lardizabal, 3, 20018 San Sebastian, Spain² Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

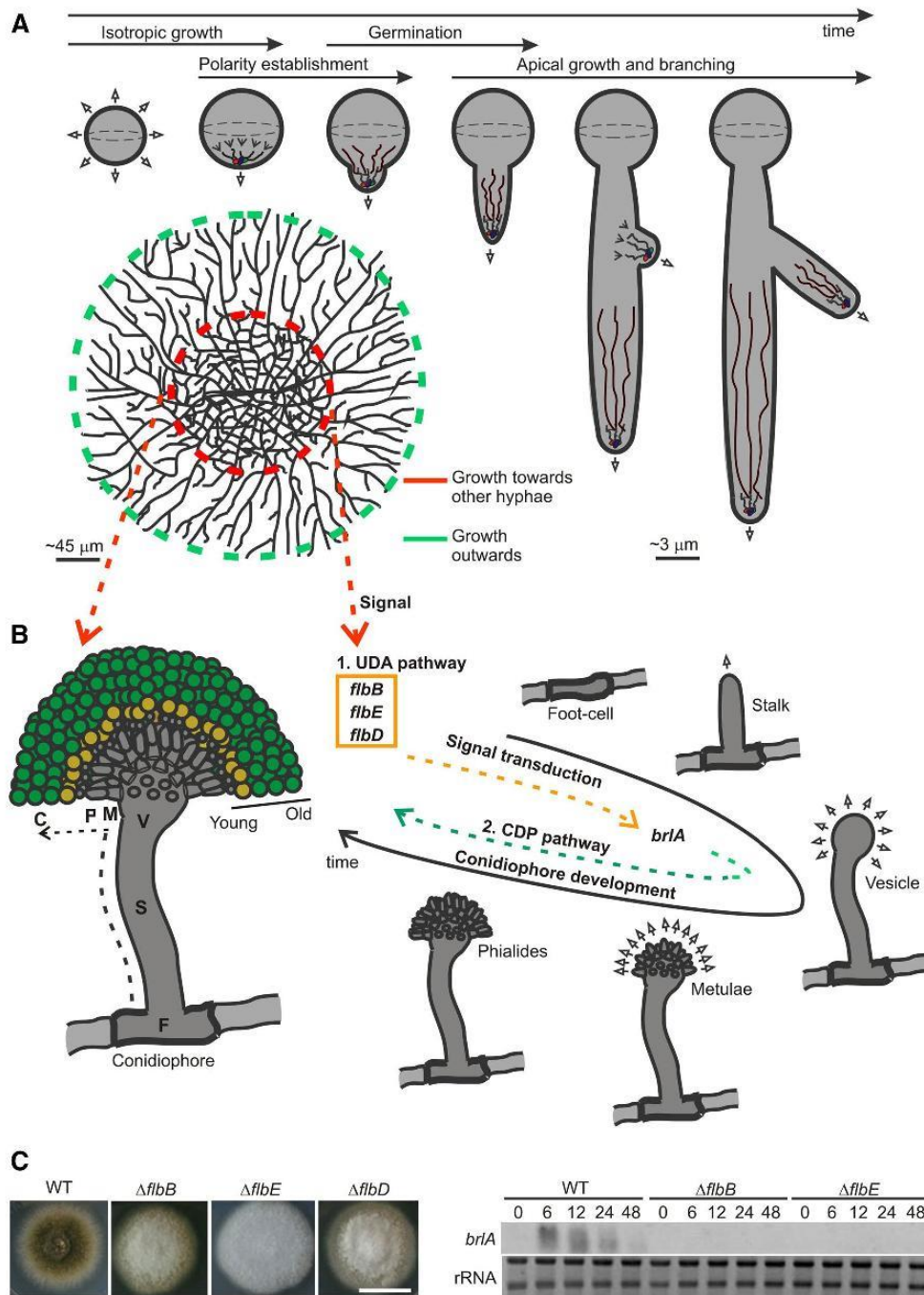
of the invasive phase (Fig. 1a). A combination of external (air, light or stress) and internal (metabolites) cues causes in *A. nidulans* the induction of asexual development (Etxebeste et al. 2010; Rodriguez-Urra et al. 2012) resulting in the production of structures called conidiophores (Fig. 1b; see below). Each conidiophore bears thousands of asexual spores or conidia, metabolically latent mitospores characterized by low water content, arrested metabolism and the presence of mycotoxins (Adams et al. 1998). Conidia production is a key step of fungal infection because it permits dispersal and the rapid propagation of mycoses (Gregory 1966). The numerous mitotic divisions required for conidia production have also been linked to an increased mutation supply and, thus, the emergence of strains resistant to fungicides (Zhang et al. 2015). *Aspergillus nidulans*, in particular, and filamentous fungi, in general, are also used as model organisms for the study of the mechanisms that control cell reprogramming and specialization in eukaryotes. Due to the relevance of asexual reproduction as a developmental program and its importance in the dissemination of mycoses, this review will summarize the knowledge on the signal transduction mechanism that genetically reprograms *A. nidulans* hyphae from the invasive (vegetative) to the dispersion (conidiation) mode.

A combination of growth and budding events drives conidiophore development in *Aspergillus nidulans*

Apparently, vegetative growth and conidiation are sequential and mutually exclusive processes separated in time by the reception and transduction of the induction signal. However, a detailed analysis of conidiation shows that its control is inexorably dependent on polar growth. During conidiophore development, apical growth events are combined with budding processes (Mims et al. 1988) (Fig. 1b). A thick-walled cell or foot cell is initially generated at hyphal compartments distal from the growing tip. The foot cell constitutes the mainstay of conidiophores. A branch called stalk emerges from the foot cell and elongates through apical extension until its tip begins to swell forming the vesicle. After a series of nuclear divisions, a massive multipolar budding at the dome of the vesicle generates metulae, uninucleated sterigmata which grow apically until they bud into phialides. This cell type gives rise to long chains of conidia. The generation of as many as 60 metulae from a single vesicle, budding of each one into two phialides and the production of up to a hundred conidia by each phialide permits the synthesis of more than 10,000 conidia per conidiophore, multiplying the probability of a successful dissemination.

Fig. 1 Vegetative growth and asexual development in *Aspergillus nidulans*. **a** Colony formation. After an initial phase of isotropic growth, a polarity site is selected within a spore. This generates the germ tube, which grows apically through the addition of plasma membrane and cell-wall materials at the apex. Branching generates new polarity sites, expanding hyphae in different directions. *Blue, red* and *green circles* represent proteins mediating exocytosis and endocytosis at the tip. *Gray* and *maroon lines* represent actin and tubulin cytoskeleton, respectively. *Gray arrows* indicate growth direction. The picture below represents a colony of *Aspergillus nidulans*. Peripheral hyphae (young hyphae; *green circle*) avoid the contact with each other and grow outwards. Hyphae in the central region (old hyphae; *red circle*) show an increased branching rate and do not avoid contact. Conidiophore development is also induced in the central region and is promoted by specific signals. **b** Genetic control and morphological transformations leading to conidiophore formation. The UDA pathway transduces environmental signals to *brlA* inducing the CDP pathway, which controls the formation of the vesicle, metulae, phialides and finally conidia (*yellow* and *green color* for young and mature conidia, respectively). *Gray arrows* indicate growth direction. *F, S, V, M, P* and *C* indicate foot cell, stalk, vesicle, metulae, phialides and conidia, respectively. **c** The aconidial *flb* (*stuffy, low-brlA*) phenotype. *Left* Phenotype of wild type, $\Delta flbB$, $\Delta flbE$ and $\Delta flbD$ strains in solid minimal medium after 72 h of culture at 37 °C. *Green color* of the wild type colony indicates the production of conidia. The cottony appearance and *white color* of mutant colonies indicate the absence of asexual development. *Scale bar* 2 cm. *Right* Northern-blot showing the expression level of *brlA* in wild type, $\Delta flbB$ and $\Delta flbE$ strains 0, 6, 12, 24 and 48 h after the induction of conidiophore development. rRNA was used as loading control. Reproduced from (Garzia et al. 2009) with permission

The metula is probably the conidiophore cell type that best represents the requirement of polarity during conidiophore formation. Although they normally bud into phialides, a reversion of the conditions that initially induced conidiophore development aborts metula-to-phialide transition, resulting in a miss-scheduled apical lengthening and the production of hyphae-like structures (Etxebeste et al. 2009). This observation demonstrated that the activation of conidiophore development is reversible and that the process is completed if the conditions that induced it prevail. The mechanism that executes budding or hyphal-like extension of metulae is completely unknown and revisiting *A. nidulans* mutants failing in metulae emergence, elongation or budding, such as *abaA* or *hymA* (Karos and Fischer 1996; Sewall et al. 1990) could provide key information. Some aberrant-metulae phenotypes correspond to mutations in genes coding for known regulators of polarity such as the Ras-GAP protein GapA, the polarisome component BemA or the GTPase RacA (Harispe et al. 2008; Leeder and Turner 2008; Virag et al. 2007). An analysis of the interaction partners of these proteins in vegetative hyphae and metulae or the comparison of the transcriptional/proteomic profiles between hyphae and dissected metulae could lead to the identification of transcripts/proteins differentially expressed and participating in the decision of budding metulae into phialides. The adaptation to *A. nidulans* of



advanced proteomic and transcriptomic procedures such as those developed by Shi and colleagues or Teichert and coworkers can be useful in this approach (Shi et al. 2015; Teichert et al. 2012).

Apical control of conidiation and tip-to-nucleus communication in vegetative hyphae

The morphological transformations described above are regulated at the molecular level by two pathways. To control the synthesis of the conidiophore cell types, genes from the central developmental pathway (CDP) establish multi-layer regulatory mechanisms (Adams et al. 1998; Park and Yu 2012). *brlA* is the first CDP gene, coding for a C2H2 TF and illustrating the complex genetic and molecular control required for building such a specific structure as the conidiophore (Fig. 1b). Several transcription factors (TF) bind *brlA* promoter and the presence of an upstream open reading frame (uORF) leads to two possible transcripts, *brlA α* and *brlA β* , each one being required at different developmental stages (Fischer and Kues 2006; Han et al. 1993). Feedback regulatory loops on *brlA* mediated by CDP TFs have also been described, refining the expression and activity of BrlA isoforms and informing about the completion of the process (Aguirre 1993; Ni and Yu 2007).

Since conidiation proceeds under specific environmental conditions, a mechanism must guarantee that those signals are correctly transduced to *brlA* promoter. Upstream developmental activators (UDAs) perform this role and thus, loss-of-function mutations in UDA genes yield undifferentiated masses of vegetative hyphae forming cotton-like colonies designated as *fluffy* (Cortese et al. 2011; Etxebeste et al. 2010; Wieser et al. 1994, 1997) (Fig. 1b, c). This aconidial phenotype is caused by a low and delayed expression of *brlA*. The application of current molecular and cellular biology techniques has furthered the establishment of

a temporal framework for important UDA proteins and the assignment of specific subcellular compartments to their activity. In addition, it has shown that those UDAs take advantage of the polar growth machinery to perform their signaling and regulatory roles from the very beginning of the vegetative stage (Etxebeste et al. 2009; Herrero-Garcia et al. 2015).

FlbB is a bZIP (basic leucine zipper)-type UDA TF essential for the induction of conidiation and constitutes the first known example of a TF locating at the tip of filamentous fungal hyphae (Etxebeste et al. 2008). Once polarity is established, FlbB accumulates at the tip of germlings, apically to the region of endocytosis and independently to the cell-cycle phase (Etxebeste et al. 2009; Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste 2014). The presence of FlbB also at the tip of growing metulae demonstrates its tight relationship with polarity. In mature vegetative hyphae, FlbB is detected in nuclei, with the highest concentration in the apical nucleus and steadily decreasing quantities in successive nuclei (Etxebeste et al. 2008). The selective green-to-red photo-conversion of the apical pool of an FlbB::Dendra2 chimera (Etxebeste and Takeshita 2015; Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste 2014) and the subsequent detection of red fluorescence in nuclei demonstrated a tip-to-nucleus migration of FlbB (Herrero-Garcia et al. 2015). Therefore, apical localization is a pre-requisite for FlbB to become transcriptionally competent and to efficiently induce *brlA* expression in nuclei (Momany 2015). Otherwise, conidiation is inhibited.

Different elements are required to target FlbB to its initial destination: the hyphal apex. Actin cytoskeleton plays an essential role in the transport from the subapex to the apex (Herrero-Garcia et al. 2015). The myosin molecular motor or additional proteins assisting this transport are completely unknown and proteomic approaches should be used in the future for their identification (number 1 in Fig. 2). How FlbB reaches the subapex is an additional

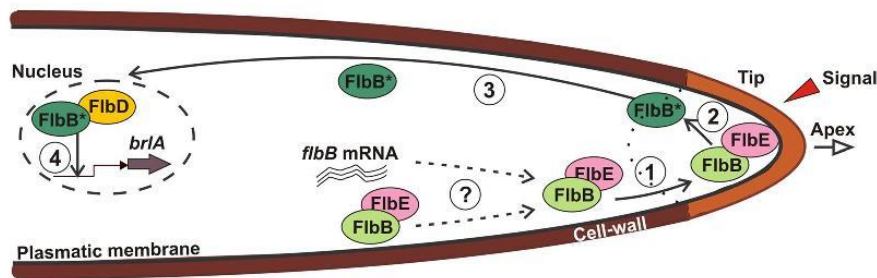


Fig. 2 FlbB dynamics and transcriptional activity in vegetative hyphae. Numbers indicate the analyses suggested in the main text. 1 and 3 identification and characterization of proteins that mediate anterograde and retrograde migration of FlbB; 2 identification

of a hypothetical post-translational modification of FlbB related to an unknown signal; and 4 elucidation of the transcriptional regulatory mechanism mediated by FlbB and FlbD at the promoter of *brlA*

intriguing question since the addition of benomyl, a microtubule (MT)-destabilizing drug, to the growth medium does not inhibit its apical accumulation (Fig. 2). MT-based anterograde transport of vesicles is the main mechanism for feeding the subapex with plasmatic membrane and cell-wall materials, which are subsequently transported on actin filaments to the plasmatic membrane at the apex (Riquelme 2013). It could be hypothesized that FlbB could travel on a specific subpopulation of MTs less affected by benomyl addition, or that an FlbB subpopulation synthesized close to the tip could join directly actin patches (Manck et al. 2015). However, the latter possibility would imply the transport of the *flbB* mRNA to a region close to the tip and it has been described that polarized transport of mRNAs in filamentous fungi and their localized or on-the-move translation are associated with endosome movement, which depends on MTs (Jansen et al. 2014).

Apical accumulation of FlbB depends on the bZIP transcriptional regulatory domain and the most C-terminal region (Herrero-Garcia et al. 2015). A fully conserved cysteine residue within the C-terminus apparently contributes to the acquisition of the three-dimensional structure required for anterograde transport. The presence within the central region of four conserved cysteine residues suggests that the C-terminal cysteine could determine the spatial conformation of FlbB through the formation of disulfide bonds with them, as occurs with Pap1, a TF that signals oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe* (Castillo et al. 2002). This possibility requires further analyses.

Dimerization domains within bZIPs mediate the formation of complexes with other bZIP- or non-bZIP proteins, regulating their subcellular localization and activity (Schutze et al. 2008). The dimerization domain of FlbB is sufficient to establish an interaction with a second UDA protein, FlbE (Garzia et al. 2009; Herrero-Garcia et al. 2015; Wieser et al. 1994). The absence of FlbE activity inhibits the apical accumulation of FlbB dispersing it in the cytoplasm. Compared to the subapical accumulation observed when actin cables are destabilized, these results strongly suggest that FlbE not only stabilizes FlbB at the tip but assist it in the anterograde transport to the apex (Herrero-Garcia et al. 2015) (Fig. 2). Bioinformatic analyses on FlbE and its orthologs (Cortese et al. 2011) revealed the presence of conserved regions predictably involved in protein–protein interactions, post-translational modifications, targeting to subcellular compartments and signal recognition (our unpublished results). The determination of the role of these domains in FlbB/E transport and localization, their interaction, as well as the ability to induce conidiation will provide key information on how filamentous fungi locate proteins involved in signal transduction at the tip.

Although speculative, it is tempting to hypothesize with the reception of a signal at the apex, which would cause

the modification and release of FlbB (number 2 in Fig. 2). Proteins mediating the tip-to-nucleus migration of FlbB are completely unknown and proteomic approaches should be used for their identification (number 3 in Fig. 2; see also next section). Nuclear accumulation of FlbB requires a bipartite nuclear localization signal (NLS) located close to the bZIP domain (Herrero-Garcia et al. 2015). Once in the nucleus, FlbB first induces the expression of a second UDA TF known as FlbD (Garzia et al. 2010). FlbD activity is essential for the activation of *brlA* expression and also for the completion of specific stages of sexual development (Arratia-Quijada et al. 2012; Garzia et al. 2010). Second, FlbB and FlbD bind to target sequences located in a region of 300nts within *brlA* promoter (number 4 in Fig. 2) and the loss of FlbB-binding in the absence of FlbD activity suggests that both TFs cooperate in the transcriptional regulation of *brlA* expression (Garzia et al. 2010). However, the exact number and nature of target sequences within *brlA* promoter have not been determined yet. It is worth mentioning that these protein-DNA binding assays were performed using vegetative samples (absence of conidiation). This means that, under non-inducing conditions, UDAs are able to bind *brlA* promoter but the configuration of this transcriptional complex cannot trigger conidiation. Consequently, a dynamic functional relationship between FlbB and FlbD, modifications at the chromatin level and the requirement of additional proteins for *brlA* induction have been proposed (Canovas et al. 2014; Kwon et al. 2010).

The absence of the transcriptional activity of FlbB influences additional cellular processes, such as the expression of secondary metabolism genes or the modulation of the timing between sexual and asexual reproductive cycles (Oizartabal-Arano et al. 2015). Multiple studies have demonstrated that the balance between sexual and asexual development is controlled at different levels and through diverse mechanisms, such as the VeA complex (light reception and secondary metabolism), NsdD (repressor of *brlA* and activator of sexual development), OsaA and UrdA (activators of *brlA* and repressors of sex, acting downstream of VeA) or Ppo proteins (control of development by fatty-acid derivatives) (Alkahyat et al. 2015; Bayram et al. 2010; Bayram and Braus 2012; Calvo 2008; Lee et al. 2014; Oizartabal-Arano et al. 2015; Tsitsigiannis et al. 2005). In conclusion, filamentous fungi invest multiple genetic resources in a continuous crosstalk between developmental programs inhibiting one of the pathways when the other is induced.

Concluding remarks and future prospects

The induction of conidiation in *A. nidulans* requires a specific subcellular distribution of two of its regulators, FlbB

and FlbE. Most probably, the underlying signaling and transcriptional regulatory mechanism will be sensitive to any perturbation altering their localization or affecting the directional movement of FlbB between the tip and nuclei. Two lines of research should be considered for the future. On the one hand, a deeper understanding of intracellular transport processes is demanding to decipher how signaling molecules such as FlbB are located at the tip, or how the bZIP TF migrates to nuclei. Theoretically, any genetic defect causing a reduction in the apical accumulation of FlbB will inhibit its transcriptional activity and the ability to produce asexual spores. We hypothesize two groups of proteins participating in such mechanisms: those with a general role in the transport of cargoes (such as cytoskeletal or motor proteins) and those specific players coupling FlbB to the corresponding transport pathway (as seems to be FlbE). Mutations in proteins belonging to the first group are supposed to cause pleiotropic defects while mutations in proteins from the second group should show a decrease in conidia production without affecting polar extension (Etxebeste et al. 2009; Garzia et al. 2009). Screening of aconidial mutants in which apical FlbB was delocalized would permit the identification of genes/proteins from any of these two groups. However, pleiotropic (if not lethal) phenotypes can be anticipated for mutants from the first group and also false positives caused by mutations in UDA genes, which decrease FlbB levels in vegetative hyphae (Garzia et al. 2009, 2010; Herrero-Garcia et al. 2015). A proteomic analysis is also an interesting, and probably more straightforward, procedure to identify FlbB interactors assisting its anterograde or retrograde transport.

On the other hand, a second major objective would be the analysis of the functional relationship between FlbB and FlbD. How these factors are spatially and temporally coordinated with the substantial number of TFs binding *brlA* promoter must also be clarified. For example, specific target sequences for FlbB and FlbD at *brlA* promoter should be determined as well as any modification in the regulatory mechanism caused by the binding of additional TFs or co-regulators (Spitz and Furlong 2012). A hypothetic interaction between FlbB and FlbD (preceding or following DNA binding) should also be considered. The UDA pathway may well serve as a model to discover novel aspects of transcriptional regulation mediated by bZIP and cMyb TFs.

The completion of those tasks might further, through a mechanistic comparison between *A. nidulans* and filamentous fungal pathogens, the identification of new molecular targets for the impairment of asexual development or the design of inhibitors for the chemical signals inducing it.

Acknowledgments Work at the UPV/EHU was funded by the UPV/EHU (Grant EHU15/08) and the Basque Government (Grant IT599-13). Work at CIB-CSIC was funded by MINECO (BFU2012-33142). E. P-A and E. O-A hold predoctoral fellowships from UPV/EHU.

References

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:35–54
- Aguirre J (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* 8:211–218. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01565.x
- Alkahyyat F, Ni M, Kim SC, Yu JH (2015) The WOPR domain protein OsaA orchestrates development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 10:e0137554. doi:10.1371/journal.pone.0137554
- Arratia-Quijada J, Sanchez O, Scazzocchio C, Aguirre J (2012) FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation. *Eukaryot Cell* 11:1132–1142. doi:10.1128/EC.00101-12
- Bayram O, Braus GH (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* 36:1–24. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x
- Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* 47:900–908. doi:10.1016/j.fgb.2010.05.008
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013) Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Clim Change* 3:985–988 (Letter)
- Braga GU, Rangel DE, Fernandes EK, Flint SD, Roberts DW (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Curr Genet* 61:405–425. doi:10.1007/s00294-015-0483-0
- Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45:1053–1061. doi:10.1016/j.fgb.2008.03.014
- Canovas D, Marcos AT, Gacek A, Ramos MS, Gutierrez G, Reyes-Dominguez Y, Strauss J (2014) The histone acetyltransferase GenE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development. *Genetics* 197:1175–1189. doi:10.1534/genetics.114.165688
- Castillo EA, Ayte J, Chiva C, Moldon A, Carrascal M, Abian J, Jones N, Hidalgo E (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* 45:243–254. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03020.x
- Cortese MS, Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* 6:e17505. doi:10.1371/journal.pone.0017505
- Etxebeste O, Takeshita N (2015) Fluorescence-based methods for the study of protein localization, interaction, and dynamics in filamentous fungi. In: Dahms TES, Czynnemek KJ (eds) *Advanced microscopy in mycology*. Springer International Publishing, Berlin, pp 27–46
- Etxebeste O, Ni M, Garzia A, Kwon NJ, Fischer R, Yu J-H, Espeso EA, Ugalde U (2008) Basic-Zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7:38–48
- Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Araujo-Bazan L, Rodriguez-Urra AB, Garzia A, Ugalde U, Espeso EA (2009) The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 73:775–789. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06804.x
- Etxebeste O, Ugalde U, Espeso EA (2010) Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* 11:704–718. doi:10.2174/138920310794557682
- Fischer R, Kues U (2006) Asexual sporulation in mycelial fungi. In: K es U, Fischer R (eds) *The Mycota I: Growth,*

- differentiation and sexuality. The Mycota. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/3-540-28135-5_14
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484:186–194. doi:10.1038/nature10947
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* 71:172–184. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06520.x
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Ugalde U, Espeso EA (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75:1314–1324. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07063.x
- Gregory PH (1966) The fungus spore: what it is and what it does. In: Madelin MF (ed) *The fungus spore*. Butterworths, London, pp 1–13
- Gutiérrez-Correa M, Ludena Y, Ramage G, Villena GK (2012) Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1235–1253. doi:10.1007/s12010-012-9555-5
- Han S, Navarro J, Greve RA, Adams TH (1993) Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* 12:2449–2457
- Harispe L, Portela C, Scazzocchio C, Penalva MA, Gorfinkiel L (2008) Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7:141–153. doi:10.1128/EC.00346-07
- Herrero-García E, Garzia A, Cordobes S, Espeso EA, Ugalde U (2011) 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol* 115:393–400. doi:10.1016/j.funbio.2011.02.005
- Herrero-García E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Cortese MS, Markina-Inarrairaegui A, Oiartzabal-Arango E, Etxebeste O, Ugalde U, Espeso EA (2015) Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol Microbiol*. doi:10.1111/mmi.13156
- Jansen RP, Niessing D, Baumann S, Feldbrugge M (2014) mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet* 30:408–417. doi:10.1016/j.tig.2014.07.002
- Karos M, Fischer R (1996) *hymA* (hypha-like metulae), a new developmental mutant of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 142(Pt 11):3211–3218. doi:10.1099/13500872-142-11-3211
- Kwon NJ, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu JH (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 77:1203–1219. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07282.x
- Lee MK, Kwon NJ, Choi JM, Lee IS, Jung S, Yu JH (2014) NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 197:159–173. doi:10.1534/genetics.114.161430
- Leeder AC, Turner G (2008) Characterisation of *Aspergillus nidulans* polarisome component BemA. *Fungal Genet Biol* 45:897–911. doi:10.1016/j.fgb.2007.12.001
- Manck R, Ishitsuka Y, Herrero S, Takeshita N, Nienhaus GU, Fischer R (2015) Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polarised growth of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* 128:3569–3582. doi:10.1242/jcs.169094
- Mims CW, Richardson WD, Timberlake WE (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* 244:132–141
- Momany M (2015) Rite of passage: a bZIP transcription factor must transit the cell apex to become competent. *Mol Microbiol*. doi:10.1111/mmi.13224
- Ni M, Yu JH (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2:e970. doi:10.1371/journal.pone.0000970
- Oiartzabal-Arango E, Garzia A, Gorostidi A, Ugalde U, Espeso EA, Etxebeste O (2015) Beyond asexual development: modifications in the gene expression profile caused by the absence of the *Aspergillus nidulans* transcription factor FlbB. *Genetics* 199:1127–1142. doi:10.1534/genetics.115.174342
- Park HS, Yu JH (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 15:669–677. doi:10.1016/j.mib.2012.09.006
- Perez-de-Nanclares-Arregi E, Etxebeste O (2014) Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 70:33–41. doi:10.1016/j.fgb.2014.06.006
- Riquelme M (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* 67:587–609. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155652
- Rodríguez-Urra AB, Jiménez C, Nieto MI, Rodríguez J, Hayashi H, Ugalde U (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* 7:599–606. doi:10.1021/cb200455u
- Rohrig J, Kastner C, Fischer R (2013) Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 59:55–62. doi:10.1007/s00294-013-0387-9
- Schutze K, Harter K, Chaban C (2008) Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Sci* 13:247–255. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.002
- Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE (1990) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2:731–739. doi:10.1105/tpc.2.8.731
- Shi Y, Pellarin R, Fridy PC, Fernandez-Martinez J, Thompson MK, Li Y, Wang QJ, Sali A, Rout MP, Chait BT (2015) A strategy for dissecting the architectures of native macromolecular assemblies. *Nat Methods*. doi:10.1038/nmeth.3617
- Spitz F, Furlong EE (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* 13:613–626. doi:10.1038/nrg3207
- Takeshita N, Manck R, Grun N, de Vega SH, Fischer R (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* 20C:34–41. doi:10.1016/j.mib.2014.04.005
- Teichert I, Wolff G, Kuck U, Nowrousian M (2012) Combining laser microdissection and RNA-seq to chart the transcriptional landscape of fungal development. *BMC Genomics* 13:511. doi:10.1186/1471-2164-13-511
- Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 151:1809–1821. doi:10.1099/mic.0.27880-0
- Virag A, Lee MP, Si H, Harris SD (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 66:1579–1596. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06021.x
- Wieser J, Lee BN, Fondon J III, Adams TH (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 27:62–69. doi:10.1007/BF00326580
- Wieser J, Yu JH, Adams TH (1997) Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 32:218–224
- Zhang J, Debets AJ, Verweij PE, Melchers WJ, Zwaan BJ, Schoustra SE (2015) Asexual sporulation facilitates adaptation: the emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 69:2573–2586. doi:10.1111/evo.12763