

**Dinámica intracelular de los
reguladores del desarrollo asexual
en el hongo filamentoso
*Aspergillus nidulans***

Elixabet Perez de Nanclares Arregi
Donostia, 2017

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Biokimika II

Kimika Aplikatua

Kimika Fakultatea

Donostia



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Dinámica intracelular de los reguladores del desarrollo asexual en el hongo filamentoso

Aspergillus nidulans

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

Poliméricos por,

Elixabet Perez de Nanclares Arregui

2017

Directores de Tesis Doctoral:

Oier Etxebeste

Profesor Adjunto

Facultad de Ciencias Químicas

EHU/UPV

Unai Ona Ugalde

Profesor Titular

Facultad de Ciencias Químicas

EHU/UPV



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Facultad de Ciencias Químicas de Donostia (EHU/UPV) bajo la dirección del Dr. **Oier Etxebeste Juárez**, Profesor Adjunto de la UPV/EHU, y el Dr. **Unai Ona 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 Perez de Nanclares Arregi**.

“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando”

Pablo Picasso

Ama, Gari

eta Mikeli

ESKERRAK/AGRADECIMIENTOS:

Iritsi da unea! Lau urte pasa dira jada abentura edota bidai hau hasi nuenetik eta ezin bukatu denbora honetan nire ondoan egon diren pertsoneri eskerrak eman gabe.

Lehenik eta behin, prozesu honetan murgildu ninduten bi pertsoneri eman nahiko nizkieke eskerrak. Mila esker Unai eta Oier, zientzia zer den irakasteagatik eta prozesu honetan beti laguntzeko prest egoteagatik. Unai, zure bulegoko atea beti egon da zabalik edozein zalantza edota arazoei buruz hitz egin eta irtenbidea bilatzeko. Zure pazientzia eta azalpenek errazago egin dituzte urte hauek. Oier, zer esango dizut ba ez dakizunik! Beti egon zara eta zaude edozertarako. Zure animo eta indarrrik gabe zailagoa izango litzateke prozesu hau. Zure kemenak eta diskurtso positiboek aurrera egiten lagundu naute beti! Milesker bioi!

¡Ha llegado! Han pasado 4 años desde que empecé esta aventura y no podría acabarla sin dar las gracias a aquellas personas que han estado a mi lado.

Primero, quisiera dar las gracias a las dos personas que me introdujeron en este mundo. Gracias Unai y Oier, por enseñarme qué es la ciencia y estar dispuestos a ayudarme en todo momento. Unai, la puerta de tu despacho siempre ha estado abierta para cualquier pregunta o para dar solución a cualquier problema. Tu paciencia y explicaciones han facilitado estos años. Oier, ¡qué te puedo decir que ya no sepas! Siempre has estado y estás ahí para cualquier cosa. Sin tus ánimos y fuerzas sería mucho más difícil este proceso. ¡Tu fuerza y tu discurso positivo me han ayudado a tirar hacia adelante siempre! ¡Gracias a los dos!

Nahiz eta laborategian ez egon, beti laguntzeko prest egon zara, Edu. Nire zalantza eta ardurak entzun dituzu txintik ere esan gabe eta ahal izan duzun moduan irtenbide bat ematen lagundu didazu, nahiz eta zoritxarrez, skypez edota telefonoz izan den gehienetan. Marc, eskerrak ematen dizkizut nire lanean emandako laguntzagatik. Beti interesa izan duzu egiten ari nintzenaz eta aurrera egin ezinik nengoenean nire lana bideratzen lagundu didazu zure esperientzian oinarrituz. Erika, 6 000 km baino gehiagok banatzen gaituzte baina beti sentitu izan dut edozein zalantzaren aurrean idatz niezazukeela. Mila esker horregatik!

Lau urte hauetan jende asko ezagutzeko aukera izan dut laborategian eta beraiekin lan egiteko aukera ere izan dut. Guztiek utzi dute beraien arrastoa nigan eta horregatik begirunez eta irribar batekin gogoratuko ditut beti. Aitor, milesker tesiaren hasieran emandako laguntzagatik eta zientzian murgiltzen laguntzeagatik. Ane, maitia, zurekin pasatako uneak nekez ahaztuko ditut, beti egon zara behar izan

Aunque no hayas estado presente en el laboratorio siempre me has ayudado, Edu. Has escuchado mis dudas y preocupaciones con paciencia y has intentado siempre darles una solución, aunque desgraciadamente, haya sido casi siempre por skype o por teléfono. Marc, te doy las gracias por la ayuda dada. Siempre has mostrado interés por mi trabajo y cuando estaba atascada me has ayudado a encaminar mi trabajo basándote en tu experiencia. Erika, aunque nos separen más de 6 000 km, siempre he sentido que podría escribirte ante cualquier pregunta que tuviera. ¡Muchas gracias por ello!

En estos cuatro años he conocido a mucha gente en el laboratorio y he tenido la oportunidad de trabajar con ellos. Todos han dejado una huella en mí y por eso los recordaré siempre con cariño y con una sonrisa. Aitor, gracias por el apoyo recibido al comienzo de esta tesis y por ayudarme a adentrarme en la ciencia. Ane, maitia, los momentos transcurridos contigo difícilmente serán olvidados, siempre has estado cuando te he necesitado,

dudanean, ez profesionalki bakarrik. Elkarrekin egindako laborategitik kanpoko aktibitate zein denborapasek erraztu egin dituzte urte hauek. Tesiaren amaierak ez ditzala ohitura on hauek galduarazi eta urte luzeetan zehar jarrai dezagula momentu onak elkarbanatzen. Eli, nirekin batera hasi zenuen tesia eta ia batera amaitu dugu. Nire parean egon zara beti edozertarako, bai laborategiko kontuez hitz egiteko eta baita asteburuko planak elkarbanatzeko. Zurekin izandako hitzaldi zein solasaldiak faltan botako ditut! Ainara, ia nire azken urtean sartu zinen laborategian baina elkarrekin pasatako uneen oroitzapen onak gordetzen ditut. Lagun on bat izan zara! Mikel eta Martzel, a ze pare! Giro ezin hobea jarri izan duzue beti laborategian eta horrek momentu zailak arindu egin dizkit! Milesker danoi, zareten bezalakoak izateagatik!

no solamente en lo profesional. Las actividades realizadas fuera del laboratorio han facilitado sin duda alguna estos años. Que el final de esta tesis no acabe con estas buenas costumbres y que podamos compartir buenos momentos durante muchos años. Eli, comenzamos la tesis al mismo tiempo y casi la hemos acabado a la vez. Siempre has estado a mi lado para cualquier cosa, para hablar de temas del laboratorio o compartir los planes de fin de semana. ¡Echaré en falta las conversaciones que hemos tenido! Ainara, empezaste en el laboratorio el último año pero los momentos que hemos pasado juntas los guardaré siempre en mi memoria. ¡Has sido una buena amiga! Mikel y Martzel, ¡vaya par! ¡Siempre habéis puesto un ambiente increíble en el laboratorio y eso me ha aliviado en los momentos difíciles! ¡Gracias a todos por ser como soys!

Laborategikoa ez den baina urte hauek nirekin elkarbanatu dituen jendeari ere eskerrak eman nahi dizkiot. Bea, Goretti, Ana, Aitziber... guztiok prozesu bera igaro dugu, beraz, badakizue zertan ari natzaizuen. Milesker hor egoteagatik eta zuen irri eta poza nirekin konpartitzeagatik. Tesiak suposatzen duen estres eta urduritasunak arindu dizkidazue!

Azkenik, eta ez gutxiago zor dizuedalako, eskerrak eman nahi dizkiet nire koadrillakoei eta familikoei, betidanik hor egon zaretelako eta egunerokotasunean aurrera jarraitzen eta ez etsitzen lagundu didazuelako.

Eta orain bai, Mikel, bihotza, mila esker batez ere zuri, zaren bezalakoa izateagatik. Eguneroko bizitzan tesi honek suposatu duena zure azalean pairatu duzu. Egun on eta txar guztietan hor egon zara, ezin zaio gehiago eskatu pertsona bati. Mila esker bihotz-bihotzez!

Quisiera dar las gracias a la gente que no es del laboratorio pero que ha compartido estos años conmigo. Bea, Goretti, Ana, Aitziber... todas hemos pasado por lo mismo, por lo que sabéis de qué os hablo. Gracias por estar ahí y compartir conmigo vuestra sonrisa y alegría. ¡Me habéis aliviado el estrés y nerviosismo que supone la tesis!

Por último, y no porque os deba menos, quisiera dar las gracias a mi cuadrilla y familia, porque habéis estado desde siempre ahí y me habéis ayudado a tirar hacia adelante y a no perder la esperanza nunca.

Y ahora sí, Mikel, bihotza, gracias sobre todo a ti, por ser como eres. Has sufrido en tu piel el día a día de esta tesis. Has estado ahí en los buenos y malos días, no se le puede pedir más a una persona. ¡Gracias de todo corazón!

ABREVIATURAS

3'-UTR:	<i>3' untranslated region</i> o región 3' no traducida
5'-UTR:	<i>5' untranslated region</i> o region 5' no traducida
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Af:	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNasa:	Ribonucleasa
ARNm:	ARN mensajero
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
Arp:	<i>Actin related protein</i> o Proteína relacionada con la actina
bZIP:	<i>Basic Leucine Zipper Domain</i> o dominio de cremallera de leucina
cAMP:	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> o monofosfato cíclico de adenosina
CDP:	<i>Central Developmental Pathway</i> o ruta central de desarrollo
COPI:	<i>Coat Protein Complex I</i> o complejo proteico de revestimiento I
COPII:	<i>Coat Protein Complex II</i> o complejo proteico de revestimiento II
CSPD:	Disodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1]decan}-4-yl)phenyl phosphate
DAPI:	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD:	<i>DNA-binding domain</i> o dominio de unión a ADN
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DIC:	<i>Differential interference contrast</i> o microscopía diferencial de contraste de interferencia
d _p :	Diámetro de poro
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> o ácido etilendiaminotetraacético
EE:	<i>Early endosomes</i> o endosomas tempranos
FISH:	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> o hibridación fluorescente <i>in situ</i>
Flb:	<i>Fluffy, low bristle expression</i> o aconidial con baja expresión de <i>brlA</i>
FP:	<i>Fluorescent protein</i> o proteína fluorescente
FT:	Factor transcripcional

GF:	<i>Green fluorescence</i> o fluorescencia verde
GFP1:	<i>Green fluorescence primer 1</i>
GFP2:	<i>Green fluorescence primer 2</i>
GFP:	<i>Green fluorescent protein</i> o proteína fluorescente verde de la medusa <i>Aequorea victoria</i>
GSP1:	<i>Gene specific primer 1</i>
GSP2:	<i>Gene specific primer 2</i>
GSP3:	<i>Gene specific primer 3</i>
GSP4:	<i>Gene specific primer 4</i>
GST:	<i>Glutathione S-transferase</i> o glutatión-S-transferasa
h:	horas
HA:	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
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb:	kilobase
kDa:	Kilodalton (= 1000 Da)
LB:	<i>Luria-Bertani</i>
MCA:	<i>Aspergillus complete medium</i> o medio completo <i>Aspergillus</i>
mCh:	<i>Monomeric CherryRed Fluorescent Protein</i> o proteína fluorescente monomérica roja <i>CherryRed</i>
MFA:	<i>Aspergillus fermentation medium</i> o medio de fermentación <i>Aspergillus</i>
min:	minutos
MMA:	<i>Aspergillus minimal medium</i> o medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMD:	<i>Myosin motor domain</i> o dominio motor de la miosina
MMR:	<i>Aspergillus regeneration medium</i> o medio mínimo de regeneración
MMR-TOP:	<i>Aspergillus regeneration medium-TOP</i> o medio mínimo de regeneración-TOP
MOPS:	<i>3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid</i> o Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MPTs:	Modificaciones Postraduccionales
mRFP:	<i>Monomeric Red fluorescent protein</i> o proteína monomérica fluorescente roja del coral <i>Discosoma striata</i>
MTOCs:	<i>Microtubule Organizing Centers</i> o Centros Organizadores de Microtúbulos

NLS:	<i>Nuclear localization signal</i> o señal de localización nuclear
ORF:	<i>Open reading frame</i> o marco abierto de lectura
PABA:	<i>Para-aminobenzoic acid</i> o ácido para-aminobenzoico
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i> o tampón fosfato salino
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polietilenglicol
PP1:	<i>Promoter primer 1</i>
PP2:	<i>Promoter primer 2</i>
ppo:	<i>Psi producing oxigenase</i> u oxigenasa productora de factores psi
Psi:	<i>Precocious sexual inducer</i> o inductor sexual temprano
PVDF:	<i>Polyvinylidene fluoride</i> o fluoruro de polivinilideno
RE:	Retículo endoplasmático
RF:	<i>Red fluorescence</i> o fluorescencia roja
ROI:	<i>Region of interest</i> o región de interés
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	segundos
SDS:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> o dodecil sulfato de sodio
s.e.m.:	<i>Standard error of the meaning</i> o error estándar de la media
SMP1:	<i>Selectable marker primer 1</i>
SNARE:	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor</i> o proteína soluble de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida
TAP:	<i>Tandem Affinity Purification</i> o purificación por afinidad en tándem
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 tempranos del desarrollo
UV:	Ultravioleta
WMM:	<i>Watch minimal medium</i> o medio mínimo para microscopía de fluorescencia
WT:	<i>Wild type</i> o silvestre

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	25
1. <i>Aspergillus nidulans</i> como hongo modelo: Características generales	27
2. Crecimiento y reproducción: Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	28
2.1 Establecimiento de la polaridad y crecimiento vegetativo	28
2.2 Mecanismo de crecimiento polarizado.....	29
2.2.1 Transporte acropetal de cargos: formación de la membrana plasmática y la pared celular ...	30
2.2.2 Transporte basipetal de cargos	34
2.3 Ciclos reproductivos	36
2.3.1 Desarrollo sexual	37
2.3.2 Desarrollo asexual	38
2.3.3 Equilibrio entre el ciclo sexual y el asexual	39
3. Control genético y molecular del desarrollo asexual	41
3.1 Ruta central de la conidiación (CDP).....	41
3.2 Ruta de inducción temprana (UDA).....	44
OBJETIVOS.....	49
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados	55
1.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	55
1.2 Oligonucleótidos.....	58
1.3 Plásmidos	61
2. Condiciones y medios de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i>	64
2.1 Análisis del crecimiento en medio líquido	67
2.2 Inducción del desarrollo asexual	67
3. Recuento de conidios.....	68

4. Obtención y transformación de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i>	68
4.1 Obtención de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i>	69
4.2 Transformación de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i>	70
5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos de <i>Aspergillus nidulans</i>	71
5.1 Deleción y etiquetado de genes	71
5.2 Extracción de ADN genómico	72
5.3 Extracción de ARN total de <i>Aspergillus nidulans</i>	74
5.4 <i>Southern-blot</i>	75
5.5 <i>Northern-blot</i>	77
5.6 Mutagénesis dirigida de <i>flbB</i>	78
5.7 Expresión constitutiva de <i>flbB</i> y <i>flbE</i>	80
5.8 Mutagénesis dirigida de <i>flbE</i>	81
5.9 Fusión de <i>flbB::gfp</i> a distintos fragmentos de <i>flbE</i>	82
5.10 Etiquetados con el epítipo fotoconvertible Dendra2.....	84
6. Técnicas de biología molecular para <i>Escherichia coli</i>	85
6.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	85
6.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	85
6.3 Extracción de ADN plasmídico.....	86
6.4 Expresión de proteínas recombinantes en <i>E coli</i>	86
7. Aislamiento y manipulación de proteínas de <i>Aspergillus nidulans</i>	87
7.1 Extracción de proteínas	87
7.2 Inmunodetección de proteínas (<i>Western-blot</i>).....	90
7.3 Ensayos de retención de proteínas (<i>Pull-Down</i>).....	91
8. Microscopía de fluorescencia	92
9. Herramientas bioinformáticas	93

CAPÍTULO 3: DINÁMICA SUBCELULAR DE FlbB ENTRE LA PUNTA Y LOS NÚCLEOS DE LAS HIFAS VEGETATIVAS 95

1. Introducción.....	97
2. Transporte acropetal de FlbB	98
2.1 Papel de los citoesqueletos de tubulina y actina en el transporte acropetal de FlbB	98
2.2 Efecto de la ausencia de actividad miosina V/MyoE en la localización apical de FlbB.....	100
3. Transporte basipetal de FlbB.....	101
3.1 Puesta a punto del sistema FlbB::Dendra2	102
3.2 Seguimiento de FlbB::Dendra2 tras la fotoconversión	108
3.3 FlbB migra desde la punta de la hifa hasta el núcleo.....	110
4. Discusión.....	113

CAPÍTULO 4: DOMINIOS FUNCIONALES DE FlbB Y SU PAPEL EN LA CONIDIACIÓN Y LA INTERACCIÓN CON FlbE 117

1. Introducción.....	119
2. Papel de las cisteínas de FlbB en la conidiación.....	119
2.1 Efecto de las mutaciones C272A y C382A en la activación de <i>brlA</i> y conidiación	119
2.2 Los residuos C272 y C382 son necesarios para la localización apical de FlbB y FlbE	123
2.3 Experimento de alquilación de cisteínas de FlbB	124
3. El dominio DIM de FlbB juega un papel esencial en la interacción con FlbE.....	126
4. Discusión.....	130

CAPÍTULO 5: PAPEL DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE FlbE EN LA INTERACCIÓN CON FlbB Y LA INDUCCIÓN DE LA CONIDIACIÓN..... 135

1. Introducción.....	137
2. La expresión constitutiva de <i>flbE</i> aumenta la acumulación apical de FlbB e induce la conidiación en medio de cultivo líquido	139
3. Mutagénesis dirigida de los dominios conservados de FlbE	141
3.1 Mutagénesis dirigida en FlbE	142
3.2 Las mutaciones en los dominios E1, E3 y E4 de FlbE inhiben la conidiación	142
3.3 Las mutaciones en los dominios E1 y E4 deslocalizan a FlbB y FlbE de la punta	144
3.4 Los dominios E1 y E4 de FlbE son necesarios para la interacción con FlbB.....	146
3.5 El extremo N-terminal de FlbE es esencial para señalar la conidiación.....	146
4. La fusión de FlbE y FlbB en una única quimera permite la localización apical pero bloquea la nuclear, inhibiendo la conidiación	148
5. Discusión.....	149

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL..... 155

1. Transporte acropetal de FlbB y FlbE	158
1.1 Posibles itinerarios de transporte acropetal de FlbB y FlbE	158
1.2 Papel del citoesqueleto.....	163
2. Modelando la interacción entre FlbB y FlbE	164
3. Transporte basipetal y acumulación de FlbB en el núcleo	166

CONCLUSIONES..... 169

BIBLIOGRAFÍA..... 173

CAPÍTULO 7: ANEXOS	189
ANEXO 1. Localización subcelular de FlbB::Dendra2, expresado a través de <i>gpdA^{mini}</i>, antes y después de la fotoconversión	191
ANEXO 2. Solubilidad de las quimeras GST::FlbB expresadas en <i>E. coli</i>	193
ANEXO 3. Artículo científico.....	195
ANEXO 4. Artículo científico.....	205
ANEXO 5. Revisión	223

CAPÍTULO 1: Introducción

1. *Aspergillus nidulans* como hongo modelo: Características generales

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso modelo ampliamente empleado en el estudio de la genética y la biología celular de este tipo de organismos (Morris *et al.*, 1992; Pontecorvo *et al.*, 1953). Se clasifica dentro de la clase de los ascomicetos y el orden de los eurotiales, y es una de las más de 300 especies clasificadas dentro del género *Aspergillus* (Geiser *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2015). El impacto económico de las especies pertenecientes a este género es elevado, debido a su empleo en la industria de la fermentación para la obtención de ácido cítrico o ácido glucónico (*A. niger*), o en el procesado de comida (*A. oryzae*), y también porque varias especies son patógenos de animales, plantas o frutas (*A. fumigatus*, *A. flavus* o *A. parasiticus*) (Taylor *et al.*, 1993).

A. nidulans cumple con los criterios generales de los organismos modelo (Taylor *et al.*, 1993), no sólo por su proximidad evolutiva con las especies previamente mencionadas, sino también por la relativamente corta duración y elevada reproducibilidad de sus ciclos de crecimiento y reproducción, tanto el sexual como el asexual (ver secciones posteriores), en condiciones de laboratorio. Ello permite un crecimiento rápido, el intercambio genético entre cepas con igual o diferente dotación genética (*A. nidulans* es homotálico), el estudio de múltiples generaciones y una probabilidad elevada de que se generen mutaciones espontáneas en su genoma (Adams *et al.*, 1998). La primera secuenciación y anotación de su genoma se realizó en colaboración entre Monsanto (www.monsanto.com) y el Instituto Broad (www.broadinstitute.org) (Galagan *et al.*, 2005). Durante los últimos años, la actualización de los datos de secuenciación ha estado a cargo de la base de datos *Aspergillus Genome Database* (www.aspg.com) (Cerqueira *et al.*, 2014). Actualmente, en cambio, la información más completa y actualizada sobre su genoma, transcriptoma y proteoma está integrada en la base de datos FungiDB (Fungal and Oomycete Genomics Resources; fungidb.org/fungidb/). Esta base de datos predice que el genoma de *Aspergillus nidulans* consta de 30.52 millones de

pares de bases organizados en 8 cromosomas y 10 988 genes, de los cuales más del 80 % permanece sin caracterizar (Andersen, 2014).

2. Crecimiento y reproducción: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

El ciclo de vida de *A. nidulans* consta de fases de crecimiento y reproducción. Por un lado, la fase de crecimiento está directamente relacionada con la colonización de sustratos, constituyendo una etapa clave del proceso infeccioso en hongos patógenos. El tipo celular característico de esta fase es la hifa vegetativa, la cual, define a los hongos filamentosos (ver siguiente sección). Por otro lado, los procesos de reproducción permiten el intercambio genético entre cepas (ciclo sexual) y la generación de esporas que actúan como vehículo de dispersión hacia otros nichos (ciclo asexual) donde comenzar de nuevo con la fase de colonización (Oizartzabal-Arano *et al.*, 2016; Pereira de Souza *et al.*, 2011; Todd *et al.*, 2007). A continuación se realiza una descripción de cada una de estas fases del ciclo de vida de *A. nidulans*.

2.1 Establecimiento de la polaridad y crecimiento vegetativo

El ciclo de vida comienza con la deposición de una espora sobre un sustrato. La espora puede ser sexual (meiótica) o asexual (mitótica) (ver secciones 2.3.1 y 2.3.2, respectivamente). Tras un periodo de tiempo en estado latente, la espora comienza a crecer isotrópicamente, en todas direcciones (flechas en figura 1.1). Durante esta etapa, los materiales y la maquinaria necesarios para formar la membrana plasmática y la pared celular se dispersan a lo largo de la superficie (Momany, 2002). Tras ello, se define el punto de crecimiento, proceso que se conoce como el establecimiento de la polaridad (figura 1.1). Es este punto hacia donde se redirige el transporte intracelular de los materiales de la membrana y la pared celular, lo que permite la emergencia y extensión del tubo germinativo. Estas estructuras están

continuamente polarizadas, de modo que el transporte de cargos genera células cilíndricas y sincitiales (multinucleadas) llamadas hifas vegetativas (Kaminskyj y Hamer, 1998). Las hifas de *A. nidulans* contienen septos, tabiques porosos que dividen (pero, no aíslan) las distintas células a lo largo de una misma hifa (Harris, 2001). Además, las hifas de *A. nidulans* son capaces de generar ramificaciones, estableciendo de este modo nuevos ejes de polaridad (figura 1.1) (Momany, 2002). Las ramificaciones de las zonas periféricas de las colonias se evaden, mientras que las de las partes interiores se atraen, pudiendo llegar a fusionarse mediante un proceso denominado anastomosis (Glass *et al.*, 2004; Hickey *et al.*, 2002). La estructura generada recibe el nombre de micelio y constituye la principal estructura de la fase invasiva (Oiartzabal-Arano *et al.*, 2016).

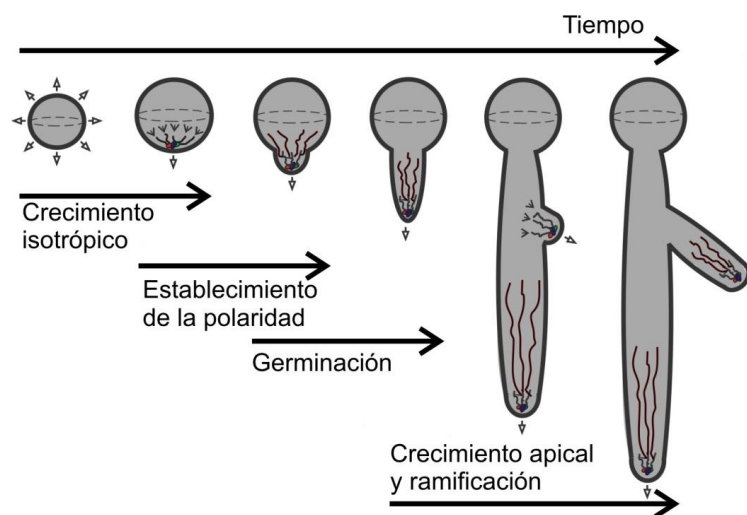


Figura 1.1: Crecimiento vegetativo en *A. nidulans*. Tras un periodo de crecimiento isotrópico, se selecciona el punto de polaridad en una espora. Este hecho genera la formación del tubo germinativo, el cual crece por el ápice de la punta a consecuencia de la adición de materiales de la membrana plasmática y la pared celular. Las ramificaciones generan nuevos puntos de polaridad, expandiendo la hifa en distintas direcciones. Modificado a partir de (Oiartzabal-Arano *et al.*, 2016).

2.2 Mecanismo de crecimiento polarizado

El establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado en hongos filamentosos requiere la síntesis y direccionamiento continuo de proteínas, lípidos y carbohidratos de la membrana plasmática y la pared celular hacia el ápice de la hifa vegetativa

(Riquelme, 2013). Debido al crecimiento polarizado permanente, los materiales depositados en el ápice pronto pasan a zonas subapicales. Tras su endocitosis, algunos de estos cargos son capaces de acoplarse de nuevo al transporte entre subápice y ápice, mientras que la mayoría de ellos son transportados a zonas distales para su reciclado (Bergs *et al.*, 2016; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Por lo tanto, las vesículas que transportan los distintos cargos siguen dos rutas principales, un primer movimiento acropetal hacia el ápice de las hifas vegetativas, en el cual tiene lugar la exocitosis, y un movimiento basipetal desde el subápice de la punta, donde la endocitosis es un proceso masivo, hacia las zonas distales de la hifa. La coordinación entre estas dos rutas es necesaria para el mantenimiento del crecimiento polar de las hifas vegetativas (Berepiki *et al.*, 2011).

2.2.1 Transporte acropetal de cargos: formación de la membrana plasmática y la pared celular

La pared celular de los hongos filamentosos, y entre ellos la de las hifas de *A. nidulans*, está compuesta por glicoproteínas y polisacáridos, principalmente glucano y quitina. El glucano es el polisacárido más abundante de la pared celular y está compuesto por monómeros de glucosa unidos mediante distintos enlaces glicosídicos. Por otro lado, la quitina es un polímero lineal formado por unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -1,4. La pared celular, al igual que la bicapa lipídica de la membrana plasmática, tiene también un componente proteico, el cual está entrelazado con la matriz de quitina y glucano (Bowman y Free, 2006).

El transporte de cargos hacia la región de crecimiento, o transporte acropetal, puede llevarse a cabo de distintas formas. En el caso de las proteínas, una posibilidad es que el ARNm correspondiente sea transportado en vesículas, sobre microtúbulos y junto con los componentes de la membrana plasmática, y que se traduzca dicho ARNm mientras se da su transporte (Jansen *et al.*, 2014). Por otro lado, el transporte acropetal de proteínas suele seguir la ruta de secreción. Se comienza con la translocación de cargos en el retículo endoplasmático (RE) (Schalén *et al.*, 2016). En *A. nidulans* el RE está polarizado y se sitúa

principalmente entre el núcleo apical y el anillo endocítico (figura 1.2) (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013). En el RE, las proteínas se pliegan y son, generalmente, modificadas (MPTs: modificaciones postraduccionales) mediante distintas reacciones como la glicosilación, la formación de puentes disulfuro o la fosforilación (Conesa *et al.*, 2001).

En un siguiente paso, las proteínas son transportadas del RE al aparato de Golgi (figura 1.2). El transporte entre el RE y Golgi se realiza mediante vesículas o *carriers* que están definidos por el tipo de recubrimiento empleado en su ensamblaje. Mientras que los *carriers* cubiertos por el complejo proteico COPII (*Coat Protein Complex II*) median el transporte entre el RE y el aparato de Golgi, las vesículas cubiertas por COPI (*Coat Protein Complex I*) operan, principalmente, en la dirección opuesta, es decir, desde el Golgi al RE (Breakspear *et al.*, 2007).

El aparato de Golgi también está altamente polarizado y se sitúa principalmente entre el RE y las inmediaciones del ápice (Minorov y Pavelka, 2008; Pinar *et al.*, 2013a). El modelo que describe el tránsito de cargos a través del aparato de Golgi es conocido como Modelo de Maduración de Cisternas (*Cisternal Maturation Model*) (Glick y Nakano, 2009). Este modelo implica que las distintas cisternas que forman el aparato de Golgi son entidades que se forman a partir del RE y que experimentan cambios a nivel proteico y lipídico hasta lograr la composición apropiada (Glick y Nakano, 2009). Por otro lado, el aparato de Golgi recibe también cargos del sistema endo-lisosomal y, por ello, este orgánulo está considerado como un cruce entre la exocitosis y la endocitosis (Minorov y Pavelka, 2008). En el aparato de Golgi los cargos se clasifican en *carriers* que son transportados hacia el ápice (Pantazopoulou, 2016). Las proteínas Rab son una familia de proteínas que regulan el tráfico de vesículas. En *A. nidulans*, el tráfico anterógrado entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática y pared celular del ápice está regulado por las proteínas RabO^{Rab1} y RabE^{Rab11}. RabO media el tráfico a lo largo de las distintas cisternas del aparato de Golgi, mientras que RabE media la salida del Golgi y su tráfico hacia el ápice (Peñalva *et al.*, 2017; Pinar *et al.*, 2015).

El citoesqueleto tiene un papel esencial en el transporte acropetal de cargos. Éstos son transportados primero sobre microtúbulos, gracias a la acción de motores moleculares denominados quinesinas (figura 1.2) (Lenz *et al.*, 2006). Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto que permiten el tráfico intracelular de larga distancia (Shukla *et al.*, 2017). Se componen de dímeros de tubulina- α y - β que se nuclean desde centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, *Microtubule Organizing Centers*; extremo minus) (ver referencias en (Steinberg, 2007)). Por otro lado, en general (y con excepciones recientemente descritas), las quinesinas son motores moleculares que se mueven en la dirección de crecimiento del microtúbulo (extremo plus), lo cual coincide casi siempre con un transporte acropetal. Se dividen en 15 familias dependiendo de su estructura (Hirokawa *et al.*, 2009). En *A. nidulans*, existen 11 genes que codifican quinesinas (Schoch *et al.*, 2003). Dentro de estos, *kinA* y *unca* codifican las quinesinas 1 y 3, respectivamente. Se ha propuesto que la quinesina-1 participa en el transporte acropetal de vesículas de secreción, de la dineína y la dinactina (ver siguiente sección), mientras que la quinesina-3 podría estar involucrada en el transporte de vesículas de secreción, endosomas tempranos (*early endosomes*, EE) y peroxisomas (Baumann *et al.*, 2012; Egan *et al.*, 2012). Sin embargo, la quinesina-14 de *A. nidulans*, KlpA, es capaz de desplazarse tanto hacia el extremo plus como hacia el extremo minus de los microtúbulos, dependiendo del dominio que emplee para realizar la unión a éstos (Popchock *et al.*, 2017; Yamada *et al.*, 2017) (ver apartado 2.2.2). Este descubrimiento reciente sugiere que la actividad de las quinesinas es más flexible de lo que se pensaba inicialmente.

Una vez que las vesículas de secreción llegan al subápice de la hifa, éstas son transferidas de los microtúbulos a los filamentos de actina (figura 1.2) (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). En hongos filamentosos existen tres tipos de estructuras basadas en F-actina: anillos, agregados y cables de actina (Berepiki *et al.*, 2011). Los anillos de actina, en cooperación con la miosina II, juegan un papel esencial en la formación de septos (Delgado-Álvarez *et al.*, 2014; Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Los agregados de actina se encuentran en las regiones donde

ocurre la endocitosis, por lo que en *A. nidulans* se acumulan principalmente en el subápice (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Upadhyay y Shaw, 2008). Finalmente, los cables de actina son filamentos lineales que se nuclean a través de forminas y que están presentes en las regiones más apicales de las hifas. En *A. nidulans*, SepA (su homólogo en levadura es Bni1p) es la formina que a través de su unión a la actina controla la nucleación de los filamentos (Harris *et al.*, 2005). Los cables de actina median el transporte entre el subápice y el ápice a través de la miosina V, MyoE en *A. nidulans* (Berepiki *et al.*, 2011; Taheri-Talesh *et al.*, 2012). En este proceso el polarisoma juega un papel esencial. Este complejo proteico controla el ensamblaje de los filamentos de actina en los sitios de polarización, siendo esencial para determinar la polaridad de la hifa (Harris *et al.*, 2005).

Los cables de actina se entrecruzan con vesículas de exocitosis de tamaño heterogéneo que se acumulan en una región denominada *Spitzenkörper* o cuerpo apical (figura 1.2) (Hohmann-Marriott *et al.*, 2006; Peñalva, 2015). Esta estructura determina la forma de la hifa y la dirección del crecimiento (figura 1.2) (Harris *et al.*, 2005; Virag y Harris, 2006). Además, se encarga del control espacial y temporal de la distribución de las vesículas de secreción hacia el ápice.

Una vez salen del *Spitzenkörper*, las vesículas de secreción se fusionan con la membrana plasmática (figura 1.2). En este proceso participan al menos tres componentes. El primero de ellos serían las proteínas Rab (Schultzhaus y Shaw, 2015). Un ejemplo es RabE, mencionado previamente y que forma parte de las vesículas de exocitosis (Pantazopoulou *et al.*, 2014). Un segundo componente serían las proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment REceptor), las cuales, son necesarias para completar la fusión con la membrana plasmática (Schultzhaus y Shaw, 2015). Las proteínas SynA y SsoA son dos ejemplos de proteínas SNARE (Schalén *et al.*, 2016; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). La primera de ellas está presente en las vesículas de secreción (*vesicle*-SNARE) mientras que la segunda se

localiza en los sitios de exocitosis de la membrana (*target-SNARE*). Por último, el exocisto es un complejo formado por 8 proteínas que controla el proceso de fusión entre vesícula y membrana (ver referencias en (Schultzhaus y Shaw, 2015)).

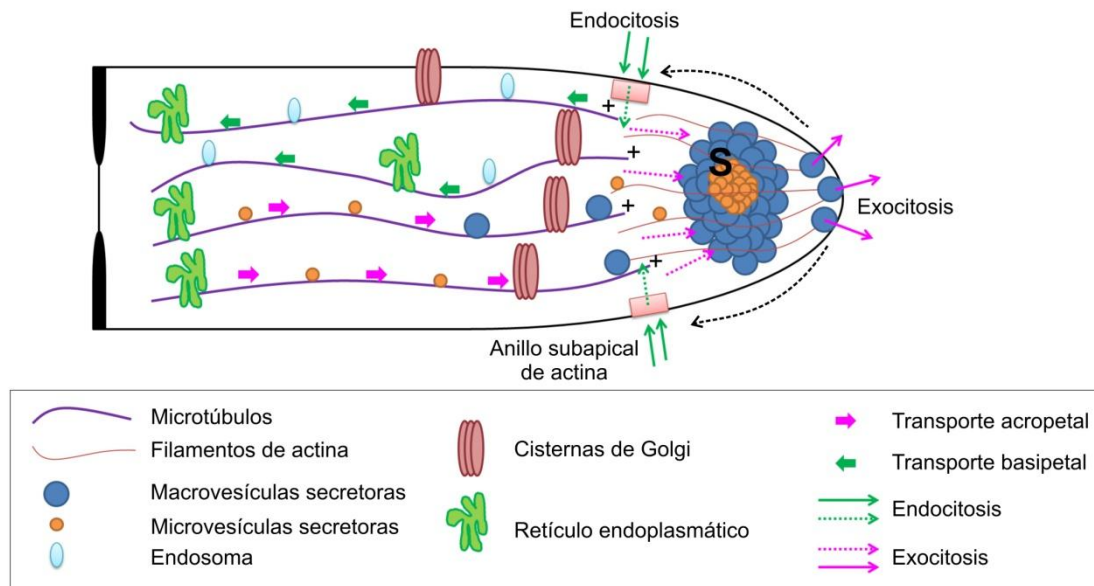


Figura 1.2: Tráfico acropetal y basipetal en hifas vegetativas de *A. nidulans*. El retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi realizan el plegamiento y maduración de las proteínas, ordenándolas en vesículas de secreción. Estas vesículas son transportadas sobre microtúbulos hacia la región subapical, donde son transferidas a los cables de actina. Las vesículas exocíticas se acumulan en el *Spitzenkörper* o cuerpo apical (indicado con la letra S en la figura). Las macrovesículas se acumulan principalmente en la región periférica del cuerpo apical mientras que las microvesículas son mayoritarias en el centro. El cuerpo apical actúa como centro suministrador de las vesículas de exocitosis (Bartnicki-García *et al.*, 1995). El transporte basipetal comienza con la generación de vesículas de endocitosis en el subápice de las hifas. Las vesículas endocíticas generadas son transportadas por el motor molecular dineína (posiblemente también la quinesina KlpA) hacia zonas distales, permitiendo su reciclado. Algunos componentes endocitados pueden acoplarse de nuevo a la ruta de secreción entre el subápice y el ápice. Modificado a partir del modelo descrito por Taheri-Talesh y colaboradores (Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

2.2.2 Transporte basipetal de cargos

El primer paso del transporte basipetal puede considerarse la endocitosis. Este es el proceso mediante el cual la membrana plasmática es internalizada para generar vesículas que se fusionan con el sistema endosomal (Peñalva, 2010; Read y Kalkman, 2003). En *A. nidulans* este proceso ocurre masivamente en el anillo subapical (figura 1.2) y, por ello, se considera que la endocitosis polariza la exocitosis en hongos filamentosos (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013; Takeshita *et al.*, 2014). Cada cargo puede tener un destino diferente. Proteínas que

participan en la exocitosis, como SynA, son reincorporadas en la ruta de secreción (Taheri-Talesh *et al.*, 2008), mientras que otros cargos son transportados hasta el lumen de la vacuola, donde se degradan (Peñalva, 2010). Recientemente, ha sido descrito que ciertas proteínas señalizadoras inicialmente localizadas en el ápice de las hifas también pueden ser transportadas al núcleo y participar en el control del desarrollo o la respuesta a estrés (ver referencias en (Etxebeste y Espeso, 2016)).

El citoesqueleto tiene también una función esencial en el transporte basipetal de vesículas y proteínas. El complejo dineína-dinactina (Zhang *et al.*, 2014) es el motor molecular principal en el transporte basipetal de cargos aunque las quinesinas de la familia 14 (KlpA en *A. nidulans*) también podrían tener actividad motora en esta dirección, ya que son capaces de desplazarse hacia el punto de nucleación o extremo minus de los microtúbulos (Popchock *et al.*, 2017; Yamada *et al.*, 2017), lo cual coincide con las zonas distales de las hifas (Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003). La dineína, además, juega funciones adicionales que son esenciales para la supervivencia del hongo, como la migración y el correcto posicionamiento de los núcleos o la orientación del huso mitótico durante la mitosis (Efimov y Morris, 1998). Para que la dineína realice su papel en el transporte basipetal de cargos, primero debe transportarse hacia y acumularse en la región apical, y unir las vesículas que debe transportar (Zhang *et al.*, 2010). Estos procesos tienen lugar mediante la quinesina-1, KinA (Zhang *et al.*, 2003). Las cadenas pesadas de la dineína son las que le confieren la actividad motora (Asai y Koonce, 2001), mientras que las cadenas ligeras permiten la unión con los distintos cargos (Steffen *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000). La dineína requiere de una correcta función de la dinactina para realizar su actividad motora. La dinactina es un complejo que contiene múltiples subunidades, incluyendo la propia dinactina y las proteínas relacionadas con la actina Arp1 y Arp11 (Arp, *actin-related protein*) (Zhang *et al.*, 2003). La interacción entre el complejo dineína y sus cargos está mediada por la acción de diferentes adaptadores. Unos de estos elementos en *A. nidulans*

es HookA (Zhang *et al.*, 2014), el cual conserva su funcionalidad al menos en *U. maydis* (Bielska *et al.*, 2014).

En conclusión, la acción coordinada del citoesqueleto, los motores moleculares y complejos proteicos específicos, entre otros, es la que permite la endocitosis y exocitosis en hifas vegetativas, dos procesos interdependientes que son esenciales para el crecimiento polar.

2.3 Ciclos reproductivos

Aspergillus nidulans ha desarrollado dos ciclos reproductivos (Adams *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2007). Dichos ciclos son mutuamente excluyentes y se inducen tras la detección y transducción de señales externas o internas como pueden ser la luz, el aire, situaciones de estrés o la presencia de metabolitos específicos (Adams *et al.*, 1998; Atoui *et al.*, 2010; Rodríguez-Urra *et al.*, 2012; Yu, 2006). El objetivo de la reproducción asexual es la propagación del hongo a nuevos sustratos (Etxebeste *et al.*, 2010a), mientras que la reproducción sexual permite el intercambio de material genético (Todd *et al.*, 2007). Normalmente, el ciclo asexual precede al sexual. Sin embargo, para facilitar la lectura se seguirá el orden inverso.

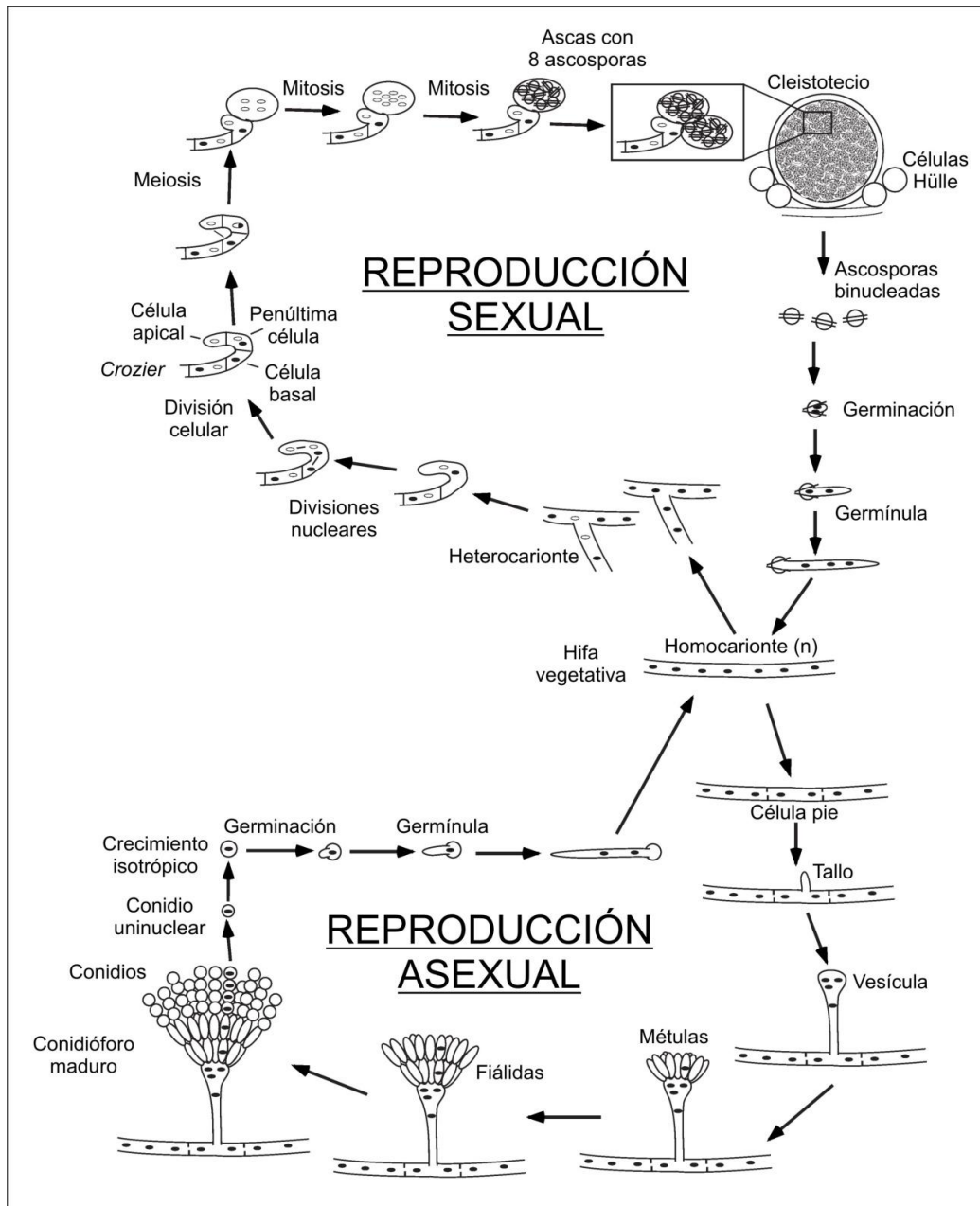


Figura 1.3: Ciclos reproductivos en *A. nidulans*. La reproducción sexual deriva en la síntesis de cleistotecios, los cuales contienen en su interior multitud de ascas. Cada ascas contiene, a su vez, ocho esporas sexuales o ascosporas. Los cleistotecios pueden llegar a contener hasta 10 000 ascosporas y se generan tras diversos procesos de meiosis y mitosis. El ciclo asexual, por su parte, deriva en la generación de conidióforos, los cuales portan miles de esporas asexuales o conidios. Los conidios se generan tras múltiples ciclos mitóticos de las células conidiogénicas, llamadas fiálidas. Ambas estructuras se generan a partir de hifas vegetativas, por lo que éstas pueden considerarse células potentes. Modificado a partir de (Todd *et al.*, 2007).

2.3.1 Desarrollo sexual

El ciclo sexual de *A. nidulans* deriva en la formación de ascosporas. Se induce en la zona más antigua de la colonia y preferentemente en ausencia de luz, ya que la luz retrasa el

inicio del desarrollo sexual (Yager, 1992). En un primer paso, se da la fusión de dos hifas homocarióticas (contienen la misma información genética en todos sus núcleos), formando una hifa heterocariótica (contiene núcleos que provienen de uno u otro parental) (figura 1.3). *A. nidulans* es homotálico, por lo que la fusión puede ocurrir entre hifas con igual o diferente dotación genética. En un segundo paso, se forma una estructura llamada *crozier* a consecuencia de la fusión de dos núcleos de la hifa heterocarionte. Tras un proceso de meiosis y dos de mitosis se genera la asca, la cual contiene 8 ascosporas (figura 1.3) (Todd *et al.*, 2007). Las ascas se encuentran dentro de unas estructuras llamadas cleistotecios, que son los cuerpos fructíferos. Cada cleistotecio contiene cientos de ascas, por lo que el número de ascosporas en cada cuerpo fructífero puede superar las 10 000 (Todd *et al.*, 2007). Los cleistotecios suelen estar rodeados de células *Hülle* (figura 1.3), las cuales se consideran fuente de nutrientes para el cleistotecio (Dyer y O'Gorman, 2012).

2.3.2 Desarrollo asexual

Aproximadamente 16 horas después de la germinación de la espora, una población de las hifas vegetativas que han sido expuestas a señales inductoras inicia una secuencia de cambios morfológicos que culmina con la formación de estructuras asexuales llamadas conidióforos (Etxebeste *et al.*, 2010a). En un primer paso, el grosor de la pared de la célula de la hifa que va a generar el conidióforo aumenta, dando lugar a la formación de la célula pie (figura 1.3) (Adams *et al.*, 1998). La célula pie constituye la base que sustentará toda la estructura que se va a generar. A partir de la célula pie emerge el tallo, el cual crece de forma polarizada. En un siguiente paso, la punta del tallo crece isotrópicamente formando una estructura globular llamada vesícula (figura 1.3). La vesícula alcanza un diámetro de alrededor de 10 μm . Contiene grandes estructuras en su interior, probablemente vacuolas, que desplazan la multitud de núcleos generados hacia la zona superior (Etxebeste *et al.*, 2009b). La vesícula sirve como plataforma para múltiples puntos de gemación de células llamadas

métulas, donde cada una recibe un núcleo de la vesícula tras un proceso de mitosis (Kües y Fischer, 2006). Tras una breve fase de crecimiento polarizado, las métulas dividen sus puntas mediante un proceso de gemación que da lugar a dos células llamadas fiálidas. Las fiálidas son visibles aproximadamente 10 horas después de inducirse el proceso (figura 1.3). Las fiálidas producen largas cadenas de conidios de un modo basipetal (Sewall *et al.*, 1990a). Esto indica que los conidios recién formados están cerca de la fiálida, mientras que los más antiguos se encuentran en el lado opuesto de la cadena. Los conidios son visibles alrededor de 15 horas después de la inducción del desarrollo asexual (figura 1.3). Cada conidióforo puede contener miles de conidios y solamente un conidio es suficiente para depositarse sobre una superficie, germinar y dar lugar a un nuevo ciclo de colonización.

2.3.3 Equilibrio entre el ciclo sexual y el asexual

Los ciclos sexual y asexual de *A. nidulans* son mutuamente excluyentes. Por ello, existen mecanismos que controlan el balance entre ambos. Algunos de estos mecanismos establecen un control químico del desarrollo mientras que otros se basan en un control molecular y transcripcional. Actúan a diferentes niveles, siendo necesarios para la inducción del ciclo reproductivo adecuado (Bayram *et al.*, 2010) o tras la inducción de éste para reprimir el segundo ciclo (Lee *et al.*, 2014). En este capítulo, se describirán dos ejemplos, uno basado en el control químico (oxilipinas) y otro de control molecular y transcripcional (complejo Velvet).

Aspergillus nidulans produce, a partir del ácido oleico y linoleico, un grupo de oxilipinas denominadas factores psi (*precocious sexual inducer*; (Champe *et al.*, 1987)). Estas moléculas modulan el balance entre el desarrollo sexual y asexual (Calvo *et al.*, 2002). Los derivados del ácido oleico (18:1) se engloban dentro de los compuestos psi β , mientras que los derivados del ácido linoleico (18:2) son conocidos como psi α (Champe *et al.*, 1987; Champe y el-Zayat, 1989). Dependiendo del posicionamiento de los grupos hidroxilo, se distinguen tres tipos de compuestos psi: psiA, psiB y psiC. Las cantidades relativas de estos tres compuestos

determinan qué ciclo reproductivo, sexual o asexual, será priorizado (Champe *et al.*, 1987; Champe y el-Zayat, 1989). Los genes *ppoA*, *ppoB* y *ppoC* (*ppo*: *psi producing oxigenase*) codifican las oxigenasas encargadas de la síntesis de los compuestos psi de *A. nidulans* (Tsitsigiannis *et al.*, 2004; Tsitsigiannis *et al.*, 2005). La delección de cualquiera de estos genes tiene un efecto significativo en la relación de los factores psi producidos y, por consiguiente, en el balance entre el desarrollo asexual y sexual (Brodhun *et al.*, 2010).

El complejo Velvet constituye uno de los principales ejemplos de control molecular del balance entre los ciclos reproductivos sexual y asexual (Calvo, 2008; Rodríguez-Romero *et al.*, 2010). Este complejo está formado por distintas subunidades y puede variar su composición dependiendo de las condiciones ambientales, principalmente luz. Ello modifica, a su vez, su localización y actividad (Bayram *et al.*, 2010). VeA es uno de los componentes centrales de este complejo. Es codificado por el gen *veA* y contiene un dominio NLS o señal de localización nuclear (Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007). VeA está presente principalmente en el citoplasma en presencia de luz, pero migra al núcleo en su ausencia (Stinnett *et al.*, 2007). La migración de VeA al núcleo depende, entre otros, de la interacción entre su dominio NLS y la importina- α , KapA (Stinnett *et al.*, 2007). La forma mutante VeA1 carece de los primeros 36 aminoácidos del extremo N-terminal, lo cual incluye la NLS (Kim *et al.*, 2002). Por lo tanto, la interacción entre KapA y VeA1 queda afectada y VeA1 se mantiene en el citoplasma tanto en la oscuridad como en presencia de luz (Stinnett *et al.*, 2007). Así, los mutantes *veA1* priorizan la formación de conidios en condiciones de oscuridad y, por ello, todas las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen a este fondo genético.

3. Control genético y molecular del desarrollo asexual

La transición entre el crecimiento vegetativo y el desarrollo asexual está controlada por dos rutas principales. La primera de ellas incluye proteínas que, estando presentes en hifas vegetativas, participan, entre otras funciones, en la transducción de las señales inductoras y el inicio de los primeros cambios morfológicos del ciclo asexual. Se denomina ruta de inducción temprana (UDA, *Upstream Developmental Activation pathway*) (Yu *et al.*, 2006). Por otro lado, la segunda ruta, denominada ruta central de la conidiación (CDP, *Central Developmental Pathway*) (Ni y Yu, 2007), regula el resto de transformaciones morfológicas que dan lugar a la formación de los conidios. *brlA* es el primer gen de la ruta CDP, se expresa específicamente durante la conidiación y actúa como regulador global al controlar la expresión del resto de genes conocidos de esta ruta (Adams *et al.*, 1998). La transferencia del control del desarrollo asexual entre la ruta UDA y la ruta CDP se da en el promotor de *brlA*. Por ello, varios de los factores UDA son factores transcripcionales (FFTT) que unen directamente a este promotor (ver más adelante) (Etxebeste *et al.*, 2009a; Garzia *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2010). Para facilitar la lectura, se describirán primero los elementos centrales conocidos en la ruta CDP, finalizando con los de la ruta UDA.

3.1 Ruta central de la conidiación (CDP)

brlA codifica un FT del tipo C₂H₂ dentro de la familia *Zn finger* (dedo de zinc). Este FT controla la expresión de otros genes necesarios para la conidiación (figura 1.4A) (Yu, 2010), por lo que sus mutantes de pérdida de función forman estructuras que se parecen a los tallos de los conidióforos pero, no producen vesículas y, por tanto, tampoco métulas, fiálidas ni conidios (Adams *et al.*, 1998). Por el contrario, la sobreexpresión de *brlA* en células vegetativas inhibe el crecimiento e induce la formación en la punta de las hifas de células similares a fiálidas, las cuales, generan un conidio cada (Adams *et al.*, 1998; Etxebeste *et al.*, 2009a).

La transcripción del gen *brlA* da lugar a dos ARNm-s diferentes, llamados *brlA α* y *brlA β* , los cuales se acumulan en niveles detectables al comienzo del desarrollo de la vesícula (Prade y Timberlake, 1993). La transcripción de *brlA β* comienza alrededor de 1 kb aguas arriba respecto al inicio de la transcripción de *brlA α* . Ésta, a su vez, comienza dentro de la secuencia intrónica de *brlA β* (Adams *et al.*, 1998). Las dos proteínas que derivan de estos transcritos difieren únicamente en que BrlA β contiene 23 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (Kües y Fischer, 2006). Cada forma parece cobrar importancia en etapas diferentes del desarrollo del conidióforo. BrlA β parece ser necesario en las etapas iniciales, mientras que BrlA α parece serlo en las etapas finales (Prade y Timberlake, 1993). Sin embargo, se desconoce la relación de esta observación con los 23 aminoácidos adicionales que incorpora BrlA β en su extremo N-terminal.

Dos de los genes CDP sometidos al control transcripcional de BrlA son *abaA* y *wetA* (figura 1.4A) (Adams *et al.*, 1998). *abaA* codifica un FT y su expresión es activada por *brlA* antes de la diferenciación de la fiálida (Andrianopoulos y Timberlake, 1994). Los mutantes nulos en *abaA* forman esterigmatas primarias (métulas) y secundarias (fiálidas) aberrantes y en vez de conidios forman una cadena de estructuras denominada como *abacus* (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al.*, 1990a). Por otro lado, WetA es necesario para la síntesis de los componentes de la pared celular de los conidios (Marshall y Timberlake, 1991). El fenotipo del mutante nulo en *wetA* es descrito como *wet-white*. Los mutantes en *wetA* forman conidióforos pero los conidios producidos no se pigmentan y muestran una inducción descontrolada de la lisis celular (Sewall *et al.*, 1990b).

Se ha descrito también la necesidad de otros genes reguladores para el correcto desarrollo del conidióforo, como *stuA*, *medA* y *vosA* (Aguirre, 1993; Busby *et al.*, 1996). Se ha propuesto que StuA y MedA controlan, a su vez, la expresión espacial y temporal de *brlA* (Aguirre, 1993). Por otro lado, *vosA* es un FT requerido en la biogénesis de trehalosa durante la

formación de conidios. La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa que mejora la integridad de las células frente a condiciones de estrés. Asimismo, se ha propuesto que VosA reprime la expresión de *brlA* una vez acabada la conidiación, cerrando así el ciclo (Ni y Yu, 2007).

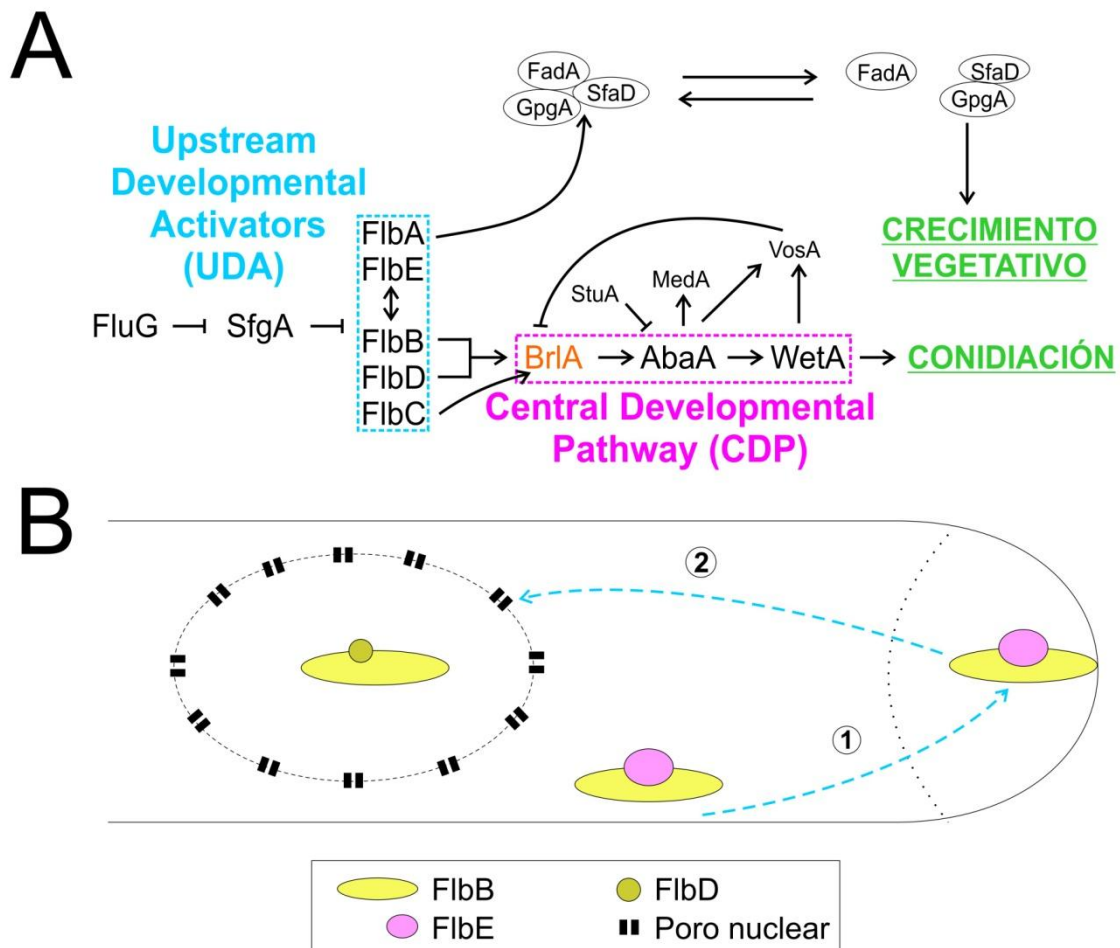


Figura 1.4: Modelo de control genético de la conidiación (A) y modelo que recoge las etapas generales de la dinámica intracelular de FlbB que se analizarán en esta tesis doctoral (B). A) La ruta de inducción temprana (UDA) (en azul) está compuesta por los genes *fluG*, *sfgA*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (ver siguiente sección). El primer gen de esta ruta es *fluG*, el cual, sería necesario, por un lado, para la activación de *flbA* y consiguiente inhibición del crecimiento vegetativo a través del control del complejo heterotrimérico formado por *FadA*, *SfaD* y *GpgA*, y por el otro lado, la inhibición de una supuesta represión ejercida por *SfgA* sobre la expresión de los genes *flb*. Ello permitiría la activación del gen maestro *brlA*, aunque se propone que hay dos rutas posibles para ello. La primera de ellas se basaría en la acción coordinada de *FlbB*, *FlbE* y *FlbD* mientras que la segunda estaría mediada por *FlbC*. Una vez activado *brlA*, el primer gen de la ruta CDP (en rosa), se activarían el resto de componentes, incluyendo *abaA* y *wetA*, derivando en la formación del conidióforo. *AbaA* regula otros genes como *medA*, *wetA* y *vosA*. Asimismo, *WetA* activa *vosA* y éste reprime la expresión de *brlA*. Modificado a partir de la tesis doctoral de la Dra. Elixabet Oiartzabal-Arano (Oiartzabal-Arano, 2016) y el trabajo de Krijghsheld y colaboradores (Krijghsheld *et al.*, 2013). B) *FlbB* es un FT de la ruta UDA que se localiza en la punta de las hifas y en los núcleos más apicales. Sin embargo, se desconoce la relación funcional que pueda existir entre estas dos poblaciones de *FlbB*, ni se ha determinado aún si el origen de la fracción nuclear de *FlbB* está en la fracción apical, como se proponía en (Etxebeste *et al.*, 2010a) (paso 2). Por otro lado, *FlbB* y *FlbE* interaccionan en la punta de las hifas vegetativas pero, se desconoce el mecanismo que siguen para localizarse allí ni el papel que podría jugar *FlbE* en el transporte acropetal de *FlbB* (paso 1).

3.2 Ruta de inducción temprana (UDA)

Entre las funciones asociadas a la actividad de los factores UDA se incluyen la transducción de señales relacionadas con la conidiación, la inhibición del crecimiento vegetativo y el control de la expresión de *brlA* (Ni *et al.*, 2010). Estudios genéticos de las décadas ochenta y noventa del siglo pasado identificaron seis genes que controlan la activación de *brlA*, los cuales fueron denominados *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (figura 1.4B) (Wieser *et al.*, 1994; Yager, 1992). Las mutaciones en cualquiera de estos genes producen un fenotipo aconidial conocido como *fluffy* debido al aspecto algodonoso que adquieren las colonias al mantener un crecimiento vegetativo ilimitado y ser incapaces de inducir la conidiación. Dicho fenotipo está causado por una menor o nula expresión de *brlA*, por lo que la mayoría de los genes que contenían las mutaciones que causaban este fenotipo fueron denominados *flb* o *fluffy with low brlA expression* (Wieser y Adams, 1995).

fluG es el primer gen de la ruta UDA. Los mutantes en *fluG* no generan conidios debido a la ausencia de un metabolito que se acumularía en la superficie de las hifas vegetativas (D'Souza *et al.*, 2001). Rodríguez-Urra y colaboradores concluyeron que el meroterpenoide deshidroaustinol podía revertir el efecto fenotípico de la ausencia de *fluG* cuando era administrado junto con el diorcinol, un derivado del ácido orselínico (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). Se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso. La sobreexpresión de la proteína FluG completa o su extremo C-terminal es suficiente para causar la activación de *brlA* y el desarrollo de conidióforos en medio líquido (D'Souza *et al.*, 2001; Lee y Adams, 1996).

Se han asignado al metabolito asociado a la actividad de FluG otras dos funciones relacionadas con la inducción de la conidiación. Por un lado, bloquearía el crecimiento vegetativo activando a FlbA, una proteína UDA con dominio RGS o regulador de la actividad de proteínas G (*Regulator of G-protein Signalling*) (Han *et al.*, 2004). Las proteínas G son complejos heterotriméricos que juegan un papel clave en la transducción de señales, al

alternar entre la forma heterotrimérica y la disociada (Han *et al.*, 2004). La acción de las proteínas G está, a su vez, ligada a receptores específicos de membrana denominados GPCR (*G-protein coupled-receptor* o *7-transmembrane domain receptor*; (Affeldt *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2015)). Aunque se desconoce el GPCR ligado a su actividad, se sabe que FlbA bloquea la disociación del complejo heterotrimérico formado por FadA (*fluffy autolytic dominant*; subunidad α de la proteína heterotrimérica), GpgA (subunidad γ) y SfaD (subunidad β) (figura 1.4A) (Adams *et al.*, 1998). Así, el complejo se mantiene y se induce el desarrollo asexual (Lafon *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2005). En consecuencia, la sobreexpresión de *flbA* inhibe el crecimiento en hifas vegetativas y estimula el desarrollo del conidióforo (Adams *et al.*, 1998). Por el otro lado, el metabolito asociado a FluG eliminaría la supuesta represión ejercida por SfgA, un FT del tipo $Zn(II)_2Cys_6$ (Seo *et al.*, 2006), sobre la expresión de los *flb*-s (figura 1.4A).

FlbC es un FT tipo C_2H_2 que se localiza en los núcleos de las hifas y de las distintas células que forman el conidióforo, excepto en los conidios (Kwon *et al.*, 2010). FlbC parece participar en una sub-ruta UDA independiente de la definida por FlbB, FlbD y FlbE (figura 1.4A). Dos proteínas de esta segunda sub-ruta, FlbB y FlbD, son FTTT. FlbB es un FT tipo bZIP (*basic Leucine Zipper domain* o dominio de cremallera básica de leucina) que constituye el primer ejemplo de un FT localizado en la punta de las hifas vegetativas (Etxebeste *et al.*, 2008). Una vez que se establece la polaridad, FlbB se acumula en la punta de las germínulas. Del mismo modo, la inhibición de la polaridad causa la deslocalización de FlbB de la punta (Etxebeste *et al.*, 2009a; Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014). La presencia de FlbB en la punta de las mótulas sustenta también la existencia de una estrecha relación de FlbB con la polaridad (Etxebeste *et al.*, 2009a). La localización apical de FlbB es actino-dependiente, mientras que los microtúbulos no parecen jugar un papel esencial en dicha localización (Garzia *et al.*, 2009). En hifas vegetativas, además de en la punta, FlbB es detectado en los núcleos. Sin embargo, la localización nuclear de FlbB sigue un gradiente de concentración, de modo que los niveles máximos se observan en el núcleo apical y éstos van disminuyendo a medida que la distancia

con respecto a la punta aumenta (Etxebeste *et al.*, 2008). No se conoce la relación exacta entre las poblaciones apical y nuclear pero, se sabe que FlbB contiene un dominio NLS (Herrero-García *et al.*, 2015; Oiartzabal-Arano, 2016) y que la inhibición de la localización apical afecta también a la nuclear (Garzia *et al.*, 2009).

Varios análisis genéticos determinaron que *flbE*, *flbB* y *flbD* actúan al mismo nivel en la ruta UDA (Lee y Adams, 1994; Wieser *et al.*, 1994; Wieser y Adams, 1995). Estudios moleculares posteriores han descrito que FlbB tiene una estrecha relación funcional con FlbD y FlbE (figura 1.4B). Por un lado, FlbE se localiza en la punta de las hifas vegetativas e interacciona con FlbB, de modo que en ausencia de uno de ellos, la localización apical del segundo queda inhibida (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-García *et al.*, 2015). En los núcleos, por el otro lado, FlbB primero induce la expresión de *flbD*, quien codifica el segundo FT, del tipo c-Myb, de esta sub-ruta UDA (Garzia *et al.*, 2010). FlbB y FlbD se unen al promotor de *brlA*, activando su expresión de forma coordinada (figura 1.4A). La delección de *flbD* disminuye significativamente la acumulación de FlbB en los núcleos, mientras que su sobreexpresión parece aumentarla (Oiartzabal-Arano, 2016). Por otro lado, la sobreexpresión de *flbD* en un fondo genético $\Delta flbB$ no es suficiente para inducir la conidiación (Garzia *et al.*, 2010). Por lo tanto, ambos factores son necesarios para la activación de *brlA*.

Aunque FlbB muestra dos localizaciones principales, apical y nuclear, se desconoce si hay una relación entre ambas poblaciones o si una depende de la otra (paso 2 en figura 1.4B). El modelo desarrollado por el grupo de acogida de la doctoranda proponía que la población nuclear de FlbB, la cual sería la encargada de controlar la expresión de *brlA* en coordinación con FlbD, provendría muy probablemente del ápice de la hifa (Etxebeste *et al.*, 2010b). Sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada aún. Al mismo tiempo, la existencia de un transporte basipetal de FlbB desde la punta al núcleo implica un transporte previo hacia el ápice de las hifas (paso 1 en figura 1.4B). Se desconocen las bases de este mecanismo y,

aunque es conocido que FlbE juega un papel central, no se ha realizado un análisis funcional de sus dominios y la relación de éstos con las distintas localizaciones de FlbB. Todas éstas son cuestiones en las que se ha profundizado en este proyecto de tesis doctoral.

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos experimentales de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Determinar la dirección y las etapas generales de la dinámica celular de FlbB en hifas vegetativas y analizar si existe una relación entre sus fracciones apical y nuclear.
2. Determinar qué dominios de FlbB son necesarios para la localización apical del FT.
3. Delimitar la extensión de los dominios más conservados en FlbE y caracterizarlos funcionalmente.

CAPÍTULO 2: Materiales y métodos

1. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados

1.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*

La tabla 2.1 recoge las cepas de *A. nidulans* utilizadas en este trabajo.

Tabla 2.1: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas durante la realización de esta tesis doctoral. Las cepas BD630 y BD946 por un lado, y BD721 y BD1053, por el otro lado, son isogénicas y se generaron como control en diferentes experimentos. Aparecen identificadas con los símbolos \mathbb{R} y \mathbb{E} , respectivamente.

Cepa	Genotipo	Fuente
BD167	<i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD177	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD178	<i>pyrG89; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; riboB2, ΔflbE::riboB^{Af}, veA1.</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD185	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD186	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; flbE::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD207	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB, pyroA4, ΔnkuA::argB; flbE::mCh::pyroA, veA1</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD294	<i>pyrG89; argB2; flbB::HA_{3x}::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Dr. Oier Etxebeste, (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
BD608	<i>pyrG89; argB2; flbB::Dendra2::pyrG^{Af}, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Dr. Oier Etxebeste (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014)
\mathbb{R} BD630	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	(Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014)
BD643	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C397A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	(Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
BD645	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C382A;C397A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	Este estudio (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
BD660	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::flbB::Dendra2]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	Dr. Oier Etxebeste (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014)
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. Oier Etxebeste, (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
\mathbb{E} BD721	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
BD723	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C382A)]_{1x}::pyroA4*,</i>	Este estudio (Herrero-García <i>et al.</i> ,

	Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af} , veA1	2015)
BD724	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(L104A;E105A)] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio (Herrero-García et al., 2015)
BD731	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; flbE^(ASP)::gfp::pyrG^{Af} , veA1	Dr. Oier Etxebeste
BD735	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; gfp::flbE , veA1	Dr. Oier Etxebeste
BD770	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio
BD773	pyrG89; argB2; pyroA4; Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::gfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio
BD841	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE::stag::pyrG^{Af} , veA1	Dra. Elixabet Oiartzabal
BD867	pyrG89; argB2; flbB::HA_{3x}::pyrG^{Af} , pabaB22, pyroA4, Δ kuA::argB; riboB2, Δ flbE::riboB ^{Af} , veA1	(Herrero-García et al., 2015)
BD918	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C272A)] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD920	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C272A)] _{2x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD921	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C280A)] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD923	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C280A)] _{2x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD925	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C236A)] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD930	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C236A)] _{2x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD936	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C303A)] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD941	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb^(C303A)] _{2x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
^m BD946	pyrG89; argB2; Δ flbB::riboB ^{Af} , pabaB22, pyrA ⁺ ::[gpdA^{mini}::gfp::flb] _{1x} ::pyroA4*, Δ kuA::argB; riboB2, veA1	Este estudio
BD995	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::gfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio
BD997	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(K51A)::gfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio
BD998	pyrG89; argB2; pyroA4, Δ kuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(Y85A;V86A)::gfp::pyrG^{Af} , veA1	Este estudio

BD1000	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(P182A)::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1001	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE^(W11A)::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1005	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE^(K51A)::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1012	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE^(D70A;D73A)::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1014	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE^(Y85A;V86A)::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1017	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE^(P182A)::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1020	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE⁽¹⁻³⁹⁾::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1023	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE^(1-39,W11A)::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1026	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE⁽¹⁻²⁰²⁾::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1029	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C236A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1037	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1047	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A;C382A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
^e BD1053	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; gpdA^{mini}::flbE::mrfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
BD1057	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A;C382A)]_{1x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	Este estudio
BD1058	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB^{Af}, pabaB22, pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A;C382A)]_{2x}::pyroA4*, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>	Este estudio
BD1060	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB, gpdA^{mini}::flbE^(D70A;D73A)::gfp::pyrG^{Af}, veA1</i>	Este estudio
MAD2949	<i>pyrG89; argB2, ΔmyoE::pyrG^{Af}; gfp::flbB, pyroA4,</i>	Dr. Oier Etxebeste

	<i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i>	
MAD4325	<i>pyrG89</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{1x}::pyroA4*</i> , <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>riboB2</i> , <i>ΔflbE::riboB^{Af}</i> , <i>veA1</i>	Dra. Erika Herrero-García (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
MAD4326	<i>pyrG89</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB]_{3x}::pyroA4*</i> , <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>riboB2</i> , <i>ΔflbE::riboB^{Af}</i> , <i>veA1</i>	Dra. Erika Herrero-García (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
MAD4328	<i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; <i>ΔflbB::riboB^{Af}</i> , <i>pabaB22</i> , <i>pyroA⁺::[gpdA^{mini}::gfp::flbB^(G382A)]_{1x}::pyroA4*</i> , <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>riboB2</i> , <i>veA1</i>	Dra. Erika Herrero-García (Herrero-García <i>et al.</i> , 2015)
TN02A3	<i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> , <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)

1.2 Oligonucleótidos

La tabla 2.2 recoge los oligonucleótidos utilizados.

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

Nombre	Secuencia (5'→3')	Objetivo
DendraUp+ GAtail	GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC GGT GCC ATG AAC ACC CCG GGA ATT AAC CTG ATC AAG G	Amplificación de Dendra2 y fusión a <i>pyrG^{Af}</i>
Dendradw+ pyrGctail	GGG TGA AGA GCA TTG TTT GAG GCG ACC GGT TCA CTT GTA CAC GCC GCT GTC GCC GGA CC	
pyrGDendraUp	GGT CCG GCG ACA GCG GCG TGT ACA AGT GAA CCG GTC GCC TCA AAC AAT GCT CTT CAC CC	Amplificación de <i>pyrG^{Af}</i> y fusión a Dendra2
pyrGYFPcDw	CTG TCT GAG AGG AGG CAC TGA TGC GTG ATG C	
flbB-GSP1	CCT CTT GTG GAT GCA CTC TGG AAT GTG GGC	Generación del <i>cassette flbB^(p)::flbB::dendra2::pyrG^{Af}</i>
flbB-GSP2	TGA ATA CAT CGT CTC ATC AGC ATG CCG GGT	
flbB-GSP3	TGA CCT GAC AGC TCG CTT TTT TTC TGA GCT TTC TAA TGC	
flbB-GSP4	GAA AGG TGC GTG GGT TCG AAT CCC ACC	
flbB-GFP1	TCC CGG CAT GCT GAT GAG ACG ATG TAT TCA GGA GCT	

	GGT GCA GGC GCT GGA GCC	
flbB-GFP2	GCA TTA GAA AGC TCA GAA AAA AAG CGA GCT GTC AGG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Generación del <i>cassette</i> <i>flbB^(p)::flbB::dendra2::pyrG^{Af}</i> y quimeras <i>gpdA^{mini}::FlbE::FlbB::GFP</i>
flbBNcoIUp	CAT GCC ATG GAT GAC TTC GAT CAG TAG TAG G	Amplificación de <i>flbB::dendra2</i> para clonarlo en el plásmido
flbBEcoRIDw	CGG AAT TCT CAC TTG TAC ACG CCG C	<i>pGPD::pyroA*</i>
flbB_motifA(-1)	GCT CAT TCC TGA TGA CAC TGC TGC TGG CGG CGT GC	Secuenciación del plásmido <i>pgpdA^{mini}::flbB::dendra2::pyroA*</i>
flbB(sek4)	GGA TCG CAG ACG GGC ATC G	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Secuenciación del plásmido
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	<i>pGEM::dendra2::pyrG^{Af}</i>
flbB-C236A up	GCT ACA GAT CCG GCT GAT GCA CTT GCC G	Construcción del plásmido
flbB-C236A dw	CGG CAA GTG CAT CAG CCG GTA CTG TAG C	<i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C236A)::pyroA*</i>
flbB-C272A up	CTG GAA TCA CCC GCT CGA GAT CAT ACC G	Construcción del plásmido
flbB-C272A dw	CGG TAT GAT CTC GAG CGG GTG ATT CCA G	<i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A)::pyroA*</i>
flbB-C280A up	CCG ACT ACC TCG CCC GAC GAT CCA TC	Construcción del plásmido
flbB-C280A dw	GAT GGA TCG TCG GGC GAG GTA GTC GG	<i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C280A)::pyroA*</i>
flbB-C303A up	GCT GAT GGC CAC CGC CCC ACC GCC AAG C	Construcción del plásmido
flbB-C303A dw	GCT TGG CGG TGG GGC GGT GGC CAT CAG C	<i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C303A)::pyroA*</i>
flbB_C382A(+1)	GAG AAC AAG GTG CGC GCA TAC GGA TTC GGG	Construcción del plásmido <i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C382A)::pyroA*</i> y secuenciación del plásmido <i>pgpdA^{mini}::flbB::Dendra2::pyroA*</i>
flbB_C382A(-1)	CCC GAA TCC GTA TGC GCG CAC CTT GTT CTC	Construcción del plásmido <i>pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C382A)::pyroA*</i>
FlbEW11AUp	CTC TAC GGC TTC CGA GCG CCC CGA GCT GG	Mutación puntual para la sustitución
FlbEW11ADw	CCA GCT CGG GGC GCT CGG AAG CCG TAG AG	W11A en FlbE
FlbEK51AUp	GGA CTC ATT TAG GGC GAC GGA GCC G	Mutación puntual para la sustitución
FlbEK51ADw	CGG CTC CGT CGC CCT AAA TGA GTC C	K51A en FlbE
FlbED70A;D73AUp	CGC TTC ATT GAA CAG TAT GCC CCC GAG GCC GAA AGC	Doble mutación para las
FlbED70A;D73ADw	GCT TTC GGC CTC GGG GGC ATA CTG TTC AAT GAA GCG	sustituciones D70A;D73A en FlbE
FlbEY85A;V86AUp	GCC TTA TGC TGC TGC TGC GAA AAC G	Doble mutación para las

FlbEY85A;V86ADw	CGT TTT CGC AGC AGC AGC AGC ATA AGG C	sustituciones Y85A;V86A en FlbE
FlbEP182AUp	GGG TCG TCT AGT AAC ACA GCG TCG ACG CCG	Mutación puntual para la sustitución P182A en FlbE
FlbEP182Dw	CGG CGT CGA CGC TGT GTT ACT AGA CGA CCC	
FlbE-SPforFlbBgeneSP	GTT CAG ATC CAA GGG TAT TGG CCT ACT ACT GAT CGA AGT CAT CGG TCT TTG TAT GTA TTC CGC CGT AGC	Generación quimeras gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻³⁹⁾ ::FlbB::GFP y gpdA ^{mini} ::FlbE ^(1-39;W11A) ::FlbB::GFP
FlbEfullforFlbBgeneSP	GTT CAG ATC CAA GGG TAT TGG CCT ACT ACT GAT CGA AGT CAT CGA AAA CGT TTT GTT GAA GAA TCG CGT TAA TGT CTC	Generación quimera gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻²⁰²⁾ ::FlbB ⁽¹⁻⁴²⁶⁾ ::GFP
FlbE-GSP3forFlbBGFP2	TGA CCT GAC AGC TCG CTT TTT TTC TGA GCT TTC TAA TGC TGA TTG CTG TAC GAG TTA TAT TAC GAC TGA TGA	Generación quimeras gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻³⁹⁾ ::FlbB::GFP, gpdA ^{mini} ::FlbE ^(1-39;W11A) ::FlbB::GFP y gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻²⁰²⁾ ::FlbB ⁽¹⁻⁴²⁶⁾ ::GFP
flbB-geneSP	ATG ACT TCG ATC AGT AGT AGG CCA ATA CCC TTG GAT CTG AAC	
flbE-PP1	GCA ACA AAT TCG GCT GTT GGG CTC AGG	Generación de gpdA ^{mini} ::flbE::gfp/mrfp/stag::pyrG ^{Af} , GFP::FlbE y FlbE ^(ΔSP) ::GFP::pyrG ^{Af}
FlbE-geneSP	ATG CCA GTC TAC ATG CTC TAC GGC TTC CGA TGG	
FlbE-PP2	CAT GGT AAG GCG ACG ACG GCC CTC	
FlbE-gfpSP	GAG GGC CGT CGT CGC CTT ACC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT	Generación de GFP::FlbE y FlbE ^(ΔSP) ::GFP::pyrG ^{Af}
FlbE-gfpFP	CCA TCG GAA GCC GTA GAG CAT GTA GAC TGG CAT TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TGT	
flbE-GSP2	CGA AAA CGT TTT GTT GAA GAA TCG CGT TAA TGT CTC	
flbE-GFP1	GAG ACA TTA ACG CGA TTC TTC AAC AAA ACG TTT TCG GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC	Generación de gpdA ^{mini} ::flbE::gfp/mrfp/stag::pyrG ^{Af}
FlbE-GFP2	TCA TCA GTC GTA ATA TAA CTC GTA CAG CAA TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	
flbE-GSP3	TGA TTG CTG TAC GAG TTA TAT TAC GAC TGA TGA	
flbE-GSP4	GCT TAC CTG CTG GAT CTC CTG CCG GTA CTT AGG	Generación de gpdA ^{mini} ::flbE::gfp/mrfp/stag::pyrG ^{Af} , quimeras gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻³⁹⁾ ::FlbB::GFP, gpdA ^{mini} ::FlbE ^(1-39;W11A) ::FlbB::GFP y gpdA ^{mini} ::FlbE ⁽¹⁻

		202)::FlbB ⁽¹⁻⁴²⁶⁾ ::GFP y GFP::FlbE
gpdA-flbE-Up	CCG AGG GCC GTC GTC GCC TTA CCC CAT CCG GTG CTC TGC ACT CGA CC	
gpdA-flbE-Dw	CCA TCG GAA GCC GTA GAG CAT GTA GAC TGG CAT CAT GGT GAT GTC TGC TCA AGC GGG G	Generación de gpdA ^{mini} ::flbE::gfp/mrfp/stag::pyrG ^{Af}
flbE-PP2'-ATG	GGT AAG GCG ACG ACG GCC CTC GG	
FlbB(sek3)	GGC GCT GGA GGA CAG GC	Secuenciación de <i>flbB</i> para confirmar la presencia de las mutaciones correspondientes a la sustitución de las cisteínas 236, 272, 280 y 303 por alaninas
FlbB(sek5)	GCG TTG CGT TTT CCC GGC	
flbB-NLS-1	GGG TTT TGG TCC TCT TGC TGC GGC AGG TTG CCC	
brlAprobe sens	CCA TGC AGA TCA GCC CTC	Sonda para analizar la expresión de brlA mediante <i>Northern-blot</i>
brlAprobe antis	CGG AAT TCG TAA ACT GAA CGG TGC TCT GG	
flbB_dim(+1)	GCA ATA CAT CAG AGC GGC AGC AAG CGA AGT TGC GCG G	Generación del plásmido pGEX-flbB 1-426 ^(L104A;E105A)
flbB_dim(-1)	CCG CGC AAC TTC GCT TGC TGC CGC TCT GAT GTA TTG C	

1.3 Plásmidos

Para la expresión de proteínas de *A. nidulans* en *Escherichia coli* se utilizaron los siguientes plásmidos:

- ❖ **pGEX-2T**: Este plásmido de la casa Pharmacia se utilizó para el etiquetado con Glutación S-transferasa (GST) del extremo amino terminal de FlbB.
- ❖ **pGEX-flbB 1-426**: Plásmido pGEX-2T con el cDNA completo de *flbB*. Se empleó para la expresión de GST::FlbB en *E. coli* (Herrero-García *et al.*, 2015).
- ❖ **pGEX-flbB 1-426^(L104A;E105A)**: Plásmido pGEX-flbB 1-426 con las mutaciones correspondientes a las sustituciones L104A y E105A, introducidas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos flbB_dim(+1) y flbB_dim(-1) (tabla 2.2 y sección 5.6) y confirmadas mediante secuenciación (Herrero-García *et al.*, 2015).

- ❖ **pGEX-flbB 1-426^(C382A)**: Plásmido pGEX-flbB 1-426 con las mutaciones correspondientes a la sustitución C382A (Herrero-García *et al.*, 2015).
- ❖ **pGEX-flbB 1-426^(C272A)**: Plásmido pGEX-flbB 1-426 con las mutaciones correspondientes a la sustitución C272A, introducidas mediante PCR con los oligonucleótidos flbB-C272A up y flbB-C272A dw (tabla 2.2 y sección 5.6) y confirmadas mediante secuenciación.
- ❖ **pGEX-flbB 1-426^(C272A;C382A)**: Plásmido pGEX-flbB 1-426 con las mutaciones correspondientes a las sustituciones C272A y C382A. Para construirlo, se partió del plásmido pGEX-flbB 1-426^(C272A) y se introdujo la mutación C382A mediante PCR empleando los oligonucleótidos flbB-C382A up y flbB-C382A dw (tabla 2.2 y sección 5.6). Se confirmó la presencia de la mutación mediante secuenciación.

Los siguientes plásmidos fueron utilizados para transformar protoplastos de *Aspergillus nidulans* o para generar construcciones con las que posteriormente transformar protoplastos:

- ❖ **pDendra2**: Plásmido comercial de la casa Clontech (www.clontech.com/). Se utilizó para obtener la secuencia de Dendra2 (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014).
- ❖ **pgfp::pyrG^{Af} (pFN03)**: Plásmido que integra el fragmento gfp::pyrG^{Af} (Yang *et al.*, 2004).
- ❖ **pGEM::^{5x}GA::Dendra2::pyrG^{Af}**: Plásmido que integra el fragmento ^{5x}GA (^{5x}[Glicina-Alanina]) junto con Dendra2::pyrG^{Af} (5.65 kb) (ver apartado 5.10 de este capítulo). Para ello, se partió de los plásmidos pDendra2 y pgfp::pyrG^{Af} (pFN03). Por un lado, mediante PCR se amplificó el gen Dendra2, introduciendo la cola ^{5x}GA en uno de los oligonucleótidos, y por otro lado, el fragmento pyrG^{Af}. Después, se unieron ambos fragmentos mediante PCR de fusión y, aprovechando la cola de poli-A, se realizó una ligación en el plásmido pGEM®-T-easy (Promega).

- ❖ **pgpdA^{mini}::pyroA***: Plásmido que integra una versión reducida (*mini*) del promotor del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gpdA^{mini}*) junto al marcador de selección *pyroA** (Pantazopoulou y Peñalva, 2009). Este promotor se utilizó para la expresión constitutiva de genes.
- ❖ **pgpdA^{mini}::flbB::Dendra2::pyroA***: Plásmido para la expresión de FlbB::Dendra2 bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. Para su construcción, se amplificó el fragmento FlbB::Dendra2 (oligonucleótidos FlbBNcoIUp y FlbBEcoRIDw), incluyendo los sitios de restricción NcoI y EcoRI en sus extremos, y se realizó la ligación en el plásmido *pgpdA^{mini}::pyroA**. La selección de transformantes de *A. nidulans* se realizó utilizando el fenotipo de *pyroA*⁺, ya que, la integración del plásmido tiene lugar en el *locus pyroA* (7.4 kb) (ver apartado 5.10 de este capítulo).
- ❖ **pgpdA^{mini}::gfp::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾-pyroA***: Plásmido generado por la Dra. Erika Herrero-García para la expresión de GFP::FlbB bajo promotor *gpdA^{mini}* (integración en el *locus pyroA*) (Herrero-García *et al.*, 2015).
- ❖ **pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C236A)-pyroA***: Plásmido generado a partir del anterior y que integra las mutaciones correspondientes a la sustitución C236A. Para introducir la mutación deseada se utilizaron los oligonucleótidos flbB-C236A up y flbB-C236A dw (tabla 2.2 y apartado 5.6).
- ❖ **gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A)-pyroA***: Plásmido *pgpdA^{mini}::gfp::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾-pyroA** que integra las mutaciones para la sustitución C272A (oligonucleótidos flbB-C272A up y flbB-C272A dw; tabla 2.2 y apartado 5.6).
- ❖ **gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C280A)-pyroA***: Plásmido *pgpdA^{mini}::gfp::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾-pyroA** con las mutaciones correspondientes a la sustitución C280A. Se utilizaron los oligonucleótidos flbB-C280A up y flbB-C280A dw (tabla 2.2 y apartado 5.6).

- ❖ **gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C303A)-pyroA***: Plásmido pgpdA^{mini}::gfp::flbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾-pyroA* con las mutaciones correspondientes a la sustitución C303A (oligonucleótidos flbB-C303A up y flbB-C303A dw; tabla 2.2 y apartado 5.6).
- ❖ **gpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A;C382A)-pyroA***: Plásmido pgpdA^{mini}::gfp::flbB^(C272A)-pyroA* en el que se introdujeron las mutaciones para la sustitución C382A (oligonucleótidos flbB-C382A up y flbB-C382A dw; tabla 2.2 y apartado 5.6).
- ❖ **pstag::pyrG^{Af}**: Plásmido que integra el epítipo *s-tag* (Liu *et al.*, 2010) junto al marcador de auxotrofia *pyrG^{Af}* (De Souza *et al.*, 2014). Este plásmido se utilizó para obtener la secuencia *stag::pyrG^{Af}* y fusionarla a gpdA^{mini}::FlbE (Dra. Elixabet Oiartzabal-Arano) (ver apartado 5.7).

2. Condiciones y medios de cultivo para *Aspergillus nidulans*

En las tablas 2.3, 2.4 y 2.5 se describen la composición de los medios de cultivo, las soluciones para la preparación de dichos medios y los suplementos utilizados, respectivamente (Cove, 1966; Käfer, 1965). Generalmente, los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C y 220-250 rpm, aunque en el caso de la transformación de protoplastos de *A. nidulans* la temperatura de incubación fue de 30 °C. En el caso de los cultivos en placa de Petri, el medio sólido utilizado fue el medio mínimo de *Aspergillus* (MMA) para los análisis fenotípicos y el medio completo (MCA) para la obtención de conidios. En los experimentos de microscopía de fluorescencia, el medio utilizado fue el medio mínimo líquido *Watch* (WMM) (Peñalva, 2005), cultivándose los conidios sin agitación y a 25 °C.

Tabla 2.3: Medios de cultivo utilizados para *A. nidulans* y el método de preparación.

Medios de cultivo	Preparación (por litro)
Medio mínimo con tartrato amónico (MMA-tartrato)	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) Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Añadir 100 mL solución de D-glucosa (2 %) Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico (5 mM)
Medio completo sólido (MCA)	MMA-tartrato + 5.0 g extracto levadura Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Medio completo líquido (MCA(l))	MCA sin agar Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Medio de regeneración (MMR)	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 Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Añadir 100 mL solución de D-glucosa (2 %) Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico (5 mM)
Medio de regeneración TOP (MMR-TOP)	MMR + 6.0 g agar Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Medio de fermentación (MFA)	20.0 mL solución de sales y elementos traza 25.0 g Corn Steep Liquor (CSL; Sigma-Aldrich) Ajustar el pH a 6.8 con NaOH Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Añadir 100 mL solución de sacarosa (3 % (p/v)) Añadir 10 mL de solución de tartrato amónico (5mM)
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 Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Añadir 5 mL NaH ₂ PO ₄ 5 M (25 mM) + 5 mL solución de D-glucosa (0.1 % (p/v)) + 10 mL de solución de tartrato amónico (5 mM)

Tabla 2.4: Soluciones para *A. nidulans* y el método de preparación.

Soluciones	Preparación (por litro)
Solución de elementos traza (10³x)	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 Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Solución 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 Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Solución de D-glucosa (10x)	200.0 g D-glucosa Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Solución de sacarosa (10x)	300.0 g sacarosa Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Solución de tartrato amónico (100x)	92.0 g tartrato amónico Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
NaH₂PO₄ 5M	599.9 g NaH ₂ PO ₄ Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Solución concentrada de vitaminas (100x)	50.0 mg tiamina 10.0 mg biotina 100.0 mg ácido nicotínico 200.0 mg D-pantotenato de calcio 50.0 mg piridoxina-HCl 100.0 mg riboflavina 100.0 mg ácido p-aminobenzoico (PABA) 24.0 g inositol Esterilizar mediante filtración Guardar a 4 °C protegido de la luz

Tabla 2.5: Suplementos utilizados para los medios de *A. nidulans*, su concentración y el método de preparación.

Suplementos	Preparación (por litro)
Biotina (10⁴x)	0.1 g biotina. Esterilizar por filtración
Ácido p-aminobenzoico (PABA) (10³x)	2.0 g ácido p-aminobenzoico Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Piridoxina (vitamina B6) (10³x)	0.5 g piridoxina Esterilizar por filtración
Inositol (100x)	12.0 g inositol Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Riboflavina (100x)	250 mg riboflavina Esterilizar por filtración
Uracilo	56 mg/100 mL (pesado en el momento y añadido al medio directamente)
Uridina	122 mg/100 mL (pesado en el momento y añadido al medio directamente)

2.1 Análisis del crecimiento en medio líquido

Se inocularon 10⁶ conidios/mL en MMA líquido con los nutrientes requeridos y se cultivaron durante 18 h. Una vez transcurrido ese periodo, se recogieron *pellets* individuales del medio y se colocaron en un portaobjetos para la observación y registro de su morfología en el microscopio (Optiphot, Nikon). Se repitió este análisis a las 24 h y 26 h.

2.2 Inducción del desarrollo asexual

Para la inducción del desarrollo asexual (Aguirre, 1993; Law y Timberlake, 1980), se inocularon 10⁶ conidios/mL y se cultivaron durante 18 h en MMA líquido (ver apartado anterior). Tras ese periodo, se filtró el micelio utilizando membranas de nitrocelulosa (Millipore, $d_p = 0.45 \mu\text{m}$). Las membranas, con una película de micelio encima, se depositaron sobre placas de Petri de 140 mm de diámetro con MMA sólido y los suplementos necesarios, y se cultivaron durante 2, 6, 12 o 24 h. Transcurrido el tiempo fijado, las muestras correspondientes se recogieron y congelaron con nitrógeno líquido, siendo posteriormente utilizadas para extraer el ARN total o liofilizadas para extraer proteína.

3. Recuento de conidios

Para el recuento de conidios, las cepas a analizar se inocularon de manera puntual en el centro de placas de Petri de 55 mm de diámetro, y se incubaron a 37 °C durante 72 h. En ese momento, se midió el diámetro de las colonias y se recogieron las esporas en tubos de 15 mL que contenían 1 mL de Tween® 20 al 0.02 % (v/v). A continuación, se hizo una dilución 1/20 y se contaron las esporas utilizando un hemocitómetro (Thoma) y un microscopio (Optihot, Nikon) equipado con un objetivo de 40 aumentos. Utilizando la medida del diámetro de la colonia y la concentración de conidios, se calculó su número por cm². Los valores medios corresponden a tres réplicas y se proporcionan junto al error estándar de la media (*s.e.m.*, *standard error of the mean*) (Etxebeste *et al.*, 2012).

4. Obtención y transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans*

La transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans* se realizó a partir de los protocolos descritos por (Szewczyk *et al.*, 2006; Tilburn *et al.*, 1983). La tabla 2.6 recoge la composición de las soluciones utilizadas.

Tabla 2.6: Soluciones utilizadas en la obtención y transformación de protoplastos.

Soluciones	Preparación (para 100 mL)
1.2 M sacarosa	41.08 g sacarosa Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Guardar a temperatura ambiente
0.6 M KCl	4.47 g KCl Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Guardar a temperatura ambiente
0.6 M KCl + 50 mM CaCl₂	4.47 g KCl 0.74 g CaCl ₂ ·2H ₂ O Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos) Guardar a temperatura ambiente
1.0 M KCl + 0.1 M ácido cítrico	8.20 g KCl 2.10 g ácido cítrico monohidratado Esterilizar por filtración ($d_p = 0.45 \mu\text{m}$) Guardar a 4 °C
Sol 7	18.22 g sorbitol 1 mL Tris-HCl (1 M, pH=7.5) 1 mL CaCl ₂ (1 M) Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)
Sol 8	60.0 g PEG (polietilenglicol; PEG6000; Fluka) 1 mL Tris-HCl (1 M, pH=7.5) 1 mL CaCl ₂ (1 M) Añadir 10 mL de agua destilada, fundir el PEG en el microondas y enrasar Esterilizar en autoclave (110 °C, 20 minutos)

4.1 Obtención de protoplastos de *Aspergillus nidulans*

Se inocularon en un matraz de 500 mL, 150 mL de MCA(l) con los suplementos necesarios y $2.5 \cdot 10^6$ conidios/mL. Se dejó crecer el inóculo durante 14 h a 30 °C en agitación (150 rpm). Una vez transcurrido ese tiempo, se filtró el micelio manteniendo las condiciones de esterilidad (Miracloth, Calbiochem®, $d_p = 22\text{-}25 \mu\text{m}$) y se lavó con MCA(l) con el objetivo de eliminar el detergente presente en el inóculo para que no interfiriera en el proceso. Se pesaron 1.5-1.8 g de micelio húmedo y se introdujeron en un matraz de 100 mL que contenía 16 mL de solución de protoplastos (2.05 g de la mezcla de enzimas líticas VinoTaste®Pro, Novozymes, y 16 mL de KCl y ácido cítrico (1.0 M y 0.1 M, respectivamente)) y 16 mL de MCA(l) fresco con los suplementos requeridos. Se recomienda preparar la solución de protoplastos por lo menos 30 minutos antes de empezar el proceso y guardarla a 4 °C (Szewczyk *et al.*, 2006). Se incubó la

mezcla a 30 °C en agitación (100 rpm) durante 90-120 minutos y se observó la aparición de protoplastos aproximadamente a partir de 60 minutos de incubación. Se recomienda mezclar la suspensión mediante agitación por *vortex* (velocidad media, 3-5 segundos) aproximadamente cada 15 minutos, para facilitar la separación de los protoplastos del micelio. Una vez obtenidos los protoplastos, la mezcla se dividió en dos tubos de polipropileno de 50 mL a los que previamente se les habían añadido 16 mL de una solución de sacarosa (1.2 M) (tabla 2.6). Es importante añadir lentamente la mezcla de protoplastos sobre la solución de sacarosa para que se formen dos fases bien definidas.

Tras ello, se centrifugaron los tubos a 1 800 g durante 10 minutos a 4 °C (Sorvall™ Biofuge Primo R, Thermo Scientific). Se recogió la banda de protoplastos (el halo de la interfase) en un tubo de polipropileno y se añadieron dos volúmenes de KCl (0.6 M), mezclando el tubo con cuidado. Se volvió a centrifugar a 1 800 g durante 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 2 mL de KCl (0.6 M) y se dividió en 2 tubos de 1.5 mL. Se centrifugó a 2 400 g durante 3 minutos a temperatura ambiente (Sorvall™ Legend™ Micro 21R, Thermo Scientific), se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 mL de 0.6 M KCl. Se repitió este último paso y se resuspendió el *pellet* en 0.5 mL de 0.6 M KCl y 50 mM de CaCl₂. Se juntó el producto de los dos tubos en un único tubo de 1.5 mL. Nuevamente, se centrifugó el tubo a 2 400 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado (protoplastos) en 1 mL de 0.6 M KCl y 50 mM CaCl₂.

4.2 Transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans*

En un tubo de 50 mL se añadieron, por este orden, 100 µl de la suspensión de protoplastos y 10 µl de ADN, tras lo cual, se mezcló mediante agitación por *vortex* 8 veces durante 1 s a velocidad máxima. Es probable que se perdieran protoplastos en la mezcla pero

este paso es crítico para facilitar la transformación de los protoplastos. A modo de control, se siguió el mismo protocolo con un tubo de 50 mL al que no se le había añadido ADN y, por tanto, no debía dar ningún transformante. Tras ello, se añadieron en cada tubo 50 μ L de solución 8 a temperatura ambiente y se mezclaron todos los componentes mediante agitación por *vortex* 4-5 veces durante 1 s a velocidad máxima. Se incubaron las mezclas durante 25 minutos en hielo.

Transcurrida esta primera incubación, se añadió 1 mL de solución 8 y se homogenizaron las muestras con las manos. Finalmente, se añadieron 5 mL de solución 7 a temperatura ambiente y MMR-TOP, previamente fundido y mantenido a 55 °C, hasta los 20 mL. Las mezclas correspondientes a los tubos con ADN se repartieron homogéneamente sobre la superficie de tres placas de Petri con medio MMR selectivo. La mezcla correspondiente al control sin ADN se repartió en dos placas, una con MMR selectivo (control donde no debía crecer ninguna colonia) y otra con MMR no-selectivo (control de regeneración de protoplastos). Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 días. Tras ello, los transformantes, se refrescaron dos veces en medio selectivo para garantizar su naturaleza homocariótica y la correcta inserción de los *cassettes* de transformación se confirmó mediante la técnica de *Southern-blot* (apartado 5.4).

5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos de *Aspergillus nidulans*

5.1 Delección y etiquetado de genes

El protocolo de PCR de fusión desarrollado por Yang y colaboradores fue la base para la delección y el etiquetado de genes de *A. nidulans* (figura 2.1) (Yang *et al.*, 2004). Para la generación de mutantes nulos, se amplificaron mediante PCR los fragmentos de ADN que contenían, por un lado, el promotor (región 5'-UTR) y, por el otro lado, el terminador (región

3'-UTR) del gen a deletar. En tercer lugar, se amplificó el marcador de selección, conteniendo colas complementarias al final del promotor y al principio del terminador del gen a deletar, respectivamente. Los tres fragmentos se fusionaron mediante PCR, quedando el marcador de selección entre las secuencias promotora y terminadora (figura 2.1A).

Para el etiquetado de proteínas en el extremo carboxilo terminal (3' en el gen) con los epítomos (TAG) GFP, HA_{3x}, mRFP o Dendra2, el fragmento de PCR de fusión que se empleó para transformar protoplastos contenía alrededor de 1.5 Kb del extremo 3' del gen que se deseaba etiquetar (ORF), el epítomo deseado seguido del marcador de selección y, finalmente, el terminador (3'-UTR) (figura 2.1B).

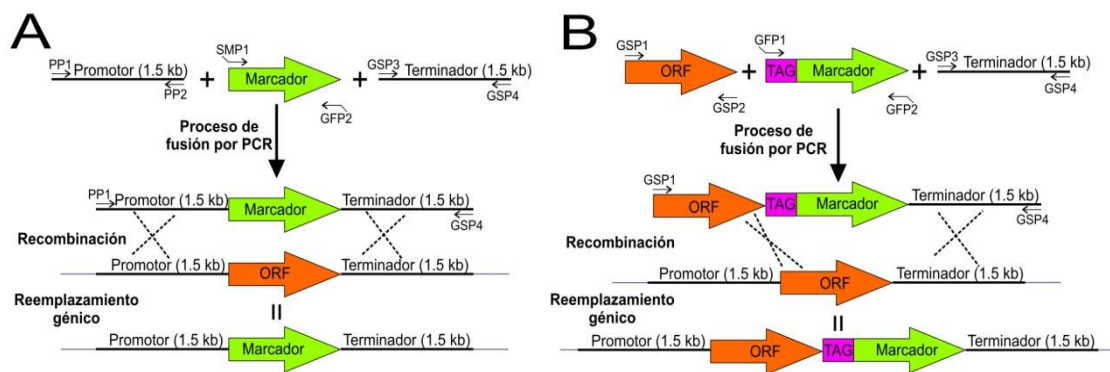


Figura 2.1: PCR de fusión y reemplazamientos génicos. A) Delección de genes. En primer lugar, se amplificaron en reacciones independientes el promotor, el marcador de selección (en verde) y el terminador utilizando los oligonucleótidos PP1/PP2, SMP1/GFP2 y GSP3/GSP4, respectivamente. Los oligonucleótidos SMP1 y GFP2, utilizados para amplificar el marcador de selección, tienen una región complementaria al final del promotor y principio del terminador, respectivamente. Se fusionaron los fragmentos mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PP1 y GSP4. En la transformación, la recombinación del producto de PCR de fusión provoca el reemplazamiento del gen a deletar (en naranja) por el marcador de selección, generando así el mutante nulo. **B) Etiquetado de genes en el extremo 3'.** Primero, se amplificaron en reacciones de PCR independientes alrededor de 1.5 kb del gen a etiquetar (sin codón stop; en naranja), el epítomo (en rosa) junto al marcador de selección (en verde) y el terminador. Para ello se utilizaron los pares de oligonucleótidos GSP1/GSP2, GFP1/GFP2 y GSP3/GSP4, respectivamente. Después, se fusionaron los tres fragmentos utilizando los oligonucleótidos GSP1 y GSP4. La transformación de protoplastos con el producto de fusión provoca el reemplazamiento del gen por una versión silvestre del mismo en la que ha sido añadido en fase el epítomo (TAG: HA_{3x}, GFP, mRFP o Dendra2).

5.2 Extracción de ADN genómico

Se inocularon 10⁶ conidios/mL en un matraz de 100 mL con 30 mL de MMA líquido y los requerimientos necesarios. Se cultivó el inóculo a 37 °C durante 16 h en agitación (220 rpm). Se filtró el micelio (Miracloth), se introdujo una alícuota en tubos de 2 mL y se liofilizó

(Cryodos, Telstar) durante 15-18 h. Se añadió una bola de acero inoxidable de 3.2 mm de diámetro (Next Advance) y se pulverizó el micelio liofilizado con el homogeneizador (Mini-Beadbeater, Biospec). Después, se añadió 1 mL de una solución que contenía 25 mM Tris-HCl (pH=8), 0.25 M sacarosa y 20 mM EDTA. Se resuspendieron las muestras y se añadieron a cada una 100 µL de SDS al 10 % (p/v). Se incubó durante 15 minutos a 65 °C. Se pasó el lisado a un nuevo tubo de 2 mL recuperando así la bola. Se fenolizó el lisado con 1 mL de fenol/SEVAG (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1) durante 10 minutos, invirtiendo las muestras regularmente. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a máxima velocidad y a temperatura ambiente y se recogió la fase superior en otro tubo de 2 mL. Se repitió la fenolización una vez más.

Tras ello, se añadió a cada muestra 0.1 y 0.6 volúmenes de AcNa 3 M (pH=6) e isopropanol, respectivamente, respecto al volumen de lo recogido previamente. Se mezcló por inversión y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 5 minutos a velocidad máxima, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado por inversión con 1 mL de etanol al 80 % (v/v). Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se secó el *pellet* mediante vacío. El precipitado se resuspendió en 300-500 µL de agua milli-Q (dependiendo del tamaño del precipitado) y se añadió 1 µL/100 µL de ARNasa (5 mg/mL) para eliminar restos de ARN. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 30-60 minutos. Se volvieron a añadir 0.1 y 0.6 volúmenes de AcNa (3 M) e isopropanol, respectivamente. Se recogió la madeja de ADN con una punta de pipeta y se transfirió a un tubo de 2 mL con 500 µL de etanol al 80 % (v/v). Finalmente, el ADN se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente y a velocidad máxima. Se secó el precipitado mediante vacío y se resuspendió en 200 µL de agua milli-Q. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) para comprobar el tamaño y la integridad del ADN extraído (una única banda a la altura de 23 kb).

5.3 Extracción de ARN total de *Aspergillus nidulans*

Se recogieron las muestras a las horas descritas en el apartado 2.2 de este capítulo y se congelaron en nitrógeno líquido. Los micelios se pulverizaron en un mortero, evitando en todo momento su descongelación. Las muestras obtenidas se transfirieron a tubos de 2 mL y se les añadió 1 mL de solución TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Se mezcló el contenido de cada tubo mediante agitación por *vortex* hasta humedecer bien todo el micelio, tras lo cual se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, invirtiéndolos regularmente. Se añadió a cada muestra 0.2 mL de cloroformo, se mezclaron los tubos mediante agitación por *vortex* y se dejaron reposar durante 3 minutos. Tras ese periodo, se centrifugaron las muestras a 12 000 g y a 4 °C durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 0.75 mL de TRI Reagent® y se repitió el proceso.

Una vez transferida la fase acuosa de cada tubo a otros nuevos, se añadieron 0.5 mL de isopropanol a cada tubo y se incubaron durante 10 minutos, invirtiéndolos periódicamente. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras a 12 000 g y a 4 °C durante 10 minutos, precipitando así el ARN. Se retiró el sobrenadante mediante vacío y se añadió 1 mL de etanol al 75 % (v/v) preparado con agua tratada con DEPC (Sigma-Aldrich) para eliminar posibles problemas por presencia de ARNasas. Después, se centrifugaron las muestras a 7 500 g y 4 °C durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y después de dejar secar el precipitado al aire, se añadieron alrededor de 100 µL de agua tratada con DEPC, dependiendo del tamaño del *pellet*. Finalmente, se midió la concentración de ARN total utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v) para confirmar la integridad de las muestras.

5.4 Southern-blot

Esta técnica permite comprobar la correcta recombinación de los distintos fragmentos de ADN utilizados para transformar protoplastos de *Aspergillus nidulans* (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó el kit DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). Las soluciones utilizadas se recogen en la tabla 2.7.

Tabla 2.7: Soluciones utilizadas durante el procedimiento de *Southern-blot*.

Soluciones	Preparación (por litro)
Solución desnaturalizante	87.66 g NaCl (1.5 M) 20.0 g NaOH (0.5 M)
Solución neutralizante	60.59 g Trizma (0.5 M) 175.3 g NaCl (3 M) Ajustar el pH a 7.5 con HCl
SSC 20x	175.3 g NaCl (3 M) 88.22 g citrato sódico (300 mM) Ajustar el pH a 7.0 con HCl
Solución Church	1.0 g BSA 50 mL de solución Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O + NaH ₂ PO ₄ 1 M pH=7 200 µL EDTA 0.5 M pH=8 35 mL SDS 20 % (p/v)
Solución de lavado	11.6 g ácido maleico (0.1 M) 8.77 g NaCl (0.15 M) 3 mL Tween® 20 (0.3 % v/v) (Acros Organics) Ajustar el pH a 7.5
Ácido maleico	11.6 g ácido maleico (0.1 M) 8.77 g NaCl (0.15 M) Ajustar el pH a 7.5 con NaOH
Solución de detección	12.11 g Trizma (0.1 M) 5.80 g NaCl (0.1 M) Ajustar el pH a 9.5

En primer lugar, se digirieron, de forma independiente, alícuotas de los ADNs parental y los de los transformantes, extraídos según el procedimiento del apartado 5.2. Se seleccionó una endonucleasa de restricción que permitiera distinguir la organización genómica del *locus* diana en los transformantes respecto al ADN parental. Tras la digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v), donde se separaron de acuerdo a su peso molecular los distintos fragmentos obtenidos en la digestión. Después, se expuso el gel a luz UV durante 5 minutos (320 nm, Vilber Lourmat). Tras ello, se desnaturalizó el ADN en solución

desnaturalizante durante 45 minutos, para permitir en etapas posteriores la hibridación del ADN de hebra simple con la sonda. Tras dos lavados de 30 minutos en solución neutralizante, se procedió con la transferencia del ADN, por capilaridad, a una membrana de nylon (Zeta-Probe® blotting, BioRad), para lo cual se utilizó la solución SSC 20x (Sambrook *et al.*, 1989).

Tras la transferencia se fijó el ADN a la membrana exponiéndola a luz UV (Vilber Lourmat, BLX-E254, 254 nm). Se realizaron dos pulsos de 120 mJ y se introdujo la membrana en un tubo de hibridación (Labnet). La pre-hibridación se realizó añadiendo solución Church (Church y Gilbert, 1984) e incubando a 42 °C y durante 2.5 h. Tras ello, se procedió a la hibridación, durante 15 h aproximadamente, de los fragmentos de ADN con una sonda específica marcada con digoxigenina-dUTP (DIG-High Prime, Roche) y previamente desnaturalizada durante 5 minutos a 95 °C. Para la generación de la sonda se añadieron previamente, en un tubo de 1.5 mL, 16 µL de ADN que fueron desnaturalizados a 95 °C durante 10 minutos. Tras dejar enfriar en hielo durante 5 minutos, se añadieron 4 µL de una solución que contenía digoxigenina-dUTP. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 16 h aproximadamente. Se inactivó la mezcla añadiendo 2 µL de EDTA (0.2 M, pH=8) y calentándola a 65 °C durante 10 minutos.

Finalizada la hibridación, se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con una solución 2x SSC + 0.1 % SDS (p/v). Nuevamente se realizaron a 65-68 °C otros dos lavados de 15 minutos cada uno con una solución 0.5x SSC + 0.1 % SDS (p/v). Después, se realizaron dos baños con solución de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó la membrana en solución bloqueante (36 mL de solución de ácido maleico y 4 mL de solución de bloqueo 10x suministrada con el Kit) con agitación suave durante 30 minutos. Tras retirar 20 mL de solución de bloqueo, se añadieron 2 µL de anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1/10 000, 75 mU/mL, Roche), incubando durante 30 minutos adicionales. Tras ello, se realizaron dos lavados de 15 minutos, seguidos de un baño con solución de detección durante

5 minutos. Para activar la reacción quimioluminiscente, se distribuyó sobre la membrana 1 mL del reactivo CSDP (Roche), dejando incubar a 37 °C durante 10 minutos. Finalmente, se expuso la membrana para obtener los resultados (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad).

5.5 Northern-blot

La técnica del *Northern-blot* permite analizar la expresión de genes de interés, en este caso, en las muestras de ARN total extraídas según el protocolo descrito en el apartado 5.3. Para ello, se preparó un gel desnaturante de agarosa (1.2 % p/v) y formaldehído (36.5-38 %, Sigma-Aldrich) fundiendo 2.4 g de agarosa (Pronadisa) en 144 mL de agua tratada con DEPC (Sigma-Aldrich). A esta mezcla se le añadieron 20 mL de MOPS 10x (0.4 M MOPS (Sigma-Aldrich), 0.1 M acetato sódico y 0.01 M EDTA) y se dejó enfriar hasta una temperatura de 42-48 °C, aproximadamente. Entonces, se añadieron 36 mL de formaldehído y una vez mezclado todo se vertió lentamente sobre el molde.

Para la preparación de las muestras se añadieron en tubos de 1.5 mL, 7 µg de ARN total, completando hasta 10 µL con agua tratada con DEPC. A ellos se añadieron 12.5 µL de formamida (N,N-dimetilformamida, Sigma-Aldrich), 2.5 µL de MOPS 10x y 4 µL de formaldehído. Tras calentar las muestras a 65 °C durante 10 minutos y dejar enfriar 2 minutos en hielo, se añadieron 3 µL de tampón de carga (50 % glicerol (v/v), 0.25 % azul de bromofenol (p/v), 0.25 % xileno cianol (p/v)) y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a 10 V durante 24 horas aproximadamente.

Finalizada la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio durante no más de 10-15 minutos. Después, se realizaron 2-3 lavados con agua destilada para eliminar el formaldehído restante y el exceso de bromuro de etidio, y se realizó la transferencia por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente (Zeta-Probe® blotting,

Bio-Rad) (Sambrook *et al.*, 1989). Tras ello, se lavó la membrana con SSC (2x) durante 5 minutos, se secó con papel de filtro y se fijaron las muestras de ARN mediante tres pulsos de luz UV (120 mJ cada uno; ver apartado 5.4) seguidos de una incubación a 80 °C durante 2 horas.

La hibridación se realizó utilizando sondas marcadas con dCTP α^{32} P, las cuales, se generaron siguiendo las indicaciones recogidas en el kit Random Primed DNA Labeling Kit (Roche). La membrana se incubó durante 16 horas a 55 °C con la sonda radioactiva previamente desnaturalizada. Tras ello, se realizaron dos lavados a temperatura ambiente con 50 mL de una solución que contenía SSC (2x) + SDS 0.1 % (p/v), seguidos de otros dos con el mismo volumen de una solución SSC (0.2x) + SDS 0.1 % (p/v). Tras cada uno de los segundos baños se monitorizó la radioactividad de la membrana con un contador Geiger. Debido a la imposibilidad de realizarlos en la Facultad de Química de la UPV/EHU, todos los pasos que implicaban el uso de material radioactivo los llevó a cabo el Dr. Eduardo A. Espeso (CIB-CSIC, Madrid).

5.6 Mutagénesis dirigida de *flbB*

Para la generación de cepas que expresaran bajo promotor *gpdA^{mini}* las quimeras mutantes de GFP::*FlbB* C236A, C272A, C280A y C303A, se mutagenizó por PCR el plásmido *pgpdA^{mini}::gfp::(1-426)-pyroA** (apartado 1.3 y figura 2.2). Se utilizaron oligonucleótidos que contenían la mutación deseada (tabla 2.2). Realizada la electroforesis y habiendo comprobado que los productos de PCR tenían el tamaño correcto (los fragmentos provenientes de la PCR no tenían estructura superenrollada y, por lo tanto, mostraban una movilidad electroforética menor en comparación con el plásmido utilizado como molde), se realizó la digestión de cada producto con la enzima DpnI (Roche) a 65 °C durante 2 horas. Esta enzima digiere su secuencia diana exclusivamente cuando las adeninas de ésta están metiladas o hidroximetiladas. Ello

ocurre en las moléculas del molde y en las híbridas (una cadena del molde y otra mutada), pero no en el producto de PCR.

Los productos de la digestión fueron utilizados para transformar las cepas DH1 o DH5 α de *E. coli* (apartado 6.2). Se extrajeron los plásmidos de diferentes clones utilizando el kit GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich) (apartado 6.3). Una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) permitió comprobar el tamaño correcto de los plásmidos. Tanto los plásmidos obtenidos como el molde tenían la misma movilidad electroforética, ya que fueron extraídos de *E. coli*. Finalmente, se confirmó la presencia de la mutación deseada en *flbB* y la ausencia de cualquier otra mutación mediante secuenciación. Alícuotas de protoplastos de una cepa $\Delta flbB::riboB^{Af}$ fueron transformadas con cada uno de los plásmidos mutantes generados, induciendo su recombinación en el *locus pyroA* (figura 2.2). Por último, se confirmó la correcta inserción de una o más copias de los plásmidos mediante *Southern-blot*.

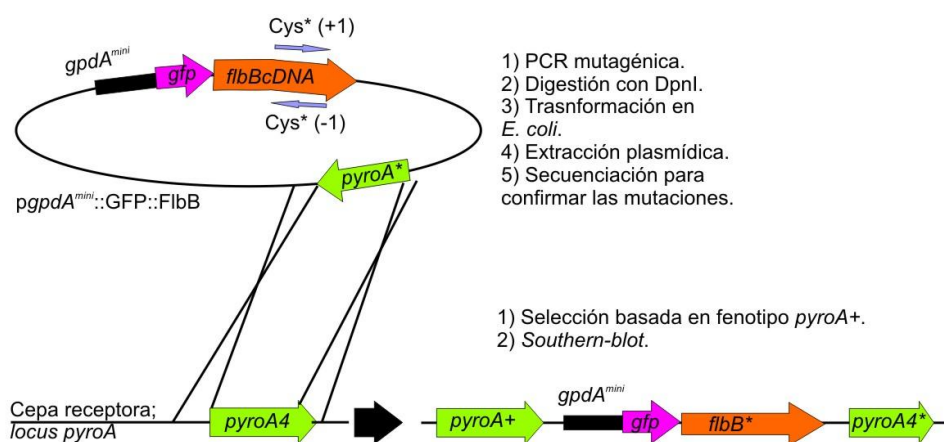


Figura 2.2: Construcción de los plásmidos y cepas mutantes en las cisteínas de FlbB. Primero, se realizó una PCR mutagénica donde los oligonucleótidos diseñados codificaban la sustitución de una de las cisteínas de *flbB* por una alanina (en negro el promotor constitutivo *gpdA^{mini}*, en rosa el epítipo *gfp* y en naranja la secuencia codificante de *flbB*). Después, se digirieron los productos de PCR con la enzima de restricción DpnI. Los productos digeridos fueron utilizados para transformar *E. coli*. Tras las extracciones plasmídicas a partir de diferentes clones bacterianos, se confirmó o descartó la presencia de la mutación deseada por secuenciación. Cada uno de los plásmidos mutantes fue utilizado para transformar protoplastos de una cepa $\Delta flbB::riboB^{Af}$, forzando su integración en el *locus pyroA* (en verde). La correcta integración se confirmó mediante *Southern-blot*.

5.7 Expresión constitutiva de *flbB* y *flbE*

Para la construcción de una fusión $gpdA^{mini}::flbE::mRFP/Stag::pyrG^{Af}$, se amplificaron por PCR cinco fragmentos (figura 2.3). Por un lado, utilizando los oligonucleótidos *flbE*-PP1 y *flbE*-PP2-ATG (tabla 2.2), se amplificó la región 5'-UTR de *flbE* (~1.5 Kb), la cual incluía la secuencia del gen *An0722*. En segundo y tercer lugar, se amplificaron el promotor constitutivo $gpdA^{mini}$ y el gen *flbE*, utilizando para ello los pares de oligonucleótidos *gpdA*-*flbE*-Up/*gpdA*-*flbE*-Dw y *flbE*-geneSP/*flbE*-GSP2, respectivamente. También se amplificaron los fragmentos *Tag*:: $pyrG^{Af}$ (*mRFP* o *Stag*) y la región 3'-UTR de *flbE* utilizando los pares de oligonucleótidos *flbE*-GFP1/*flbE*-GFP2 y *flbE*-GSP3/*flbE*-GSP4, respectivamente. Estos 5 fragmentos se fusionaron utilizando *flbE*-PP1 y *flbE*-GSP4. La fusión se utilizó para transformar protoplastos de una cepa $gpdA^{mini}::GFP::flbB::pyroA$ (figura 2.3). La recombinación se dio en el *locus* de *flbE*. Una vez obtenidos los transformantes, se analizó la correcta inserción mediante *Southern-blot*.

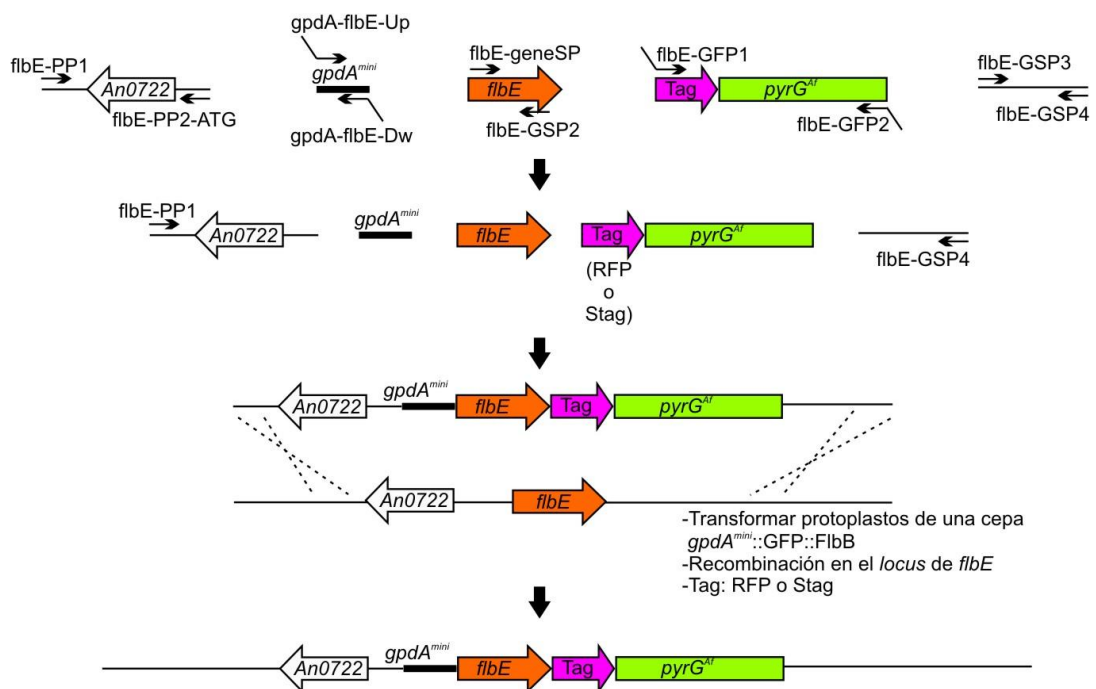


Figura 2.3: Generación de cepas que expresan quimeras de GFP::FlbB y FlbE::mRFP o Stag, ambas bajo control del promotor constitutivo $gpdA^{mini}$. Se generó el *cassette* $gpdA^{mini}::flbE::mRFP/Stag::pyrG^{Af}$ mediante una PCR de fusión de los cinco fragmentos indicados (en naranja el gen *flbE*, en rosa el epítipo y en verde el marcador de auxotrofia). La fusión se realizó utilizando los oligonucleótidos *flbE*-PP1 y *flbE*-GSP4, y se transformaron los protoplastos de una cepa $gpdA^{mini}::GFP::flbB::pyroA$. La recombinación se dio en el *locus* de *flbE*.

5.8 Mutagénesis dirigida de *flbE*

La mutagénesis de las distintas regiones conservadas de *flbE* se realizó a partir del ADN genómico de una cepa *gpdA^{mini}::flbE::GFP::pyrG^{Af}* (figura 2.4 y apartado 5.7). Utilizando dicho ADN como molde, se amplificaron dos fragmentos por cada mutación a analizar. El primero contenía la región promotora de *flbE* (1.5 kb aproximadamente), la secuencia correspondiente a *gpdA^{mini}* y parte de la secuencia codificante de *flbE* hasta la mutación deseada, y fue amplificado utilizando los oligonucleótidos flbE-PP1 y flbE*Dw (tabla 2.2). El segundo fragmento abarcaba el resto de la secuencia codificante de *flbE*, las secuencias correspondientes a GFP y *pyrG^{Af}* y el terminador (1.5 kb aproximadamente), y fue amplificado utilizando los oligonucleótidos flbE*Up y flbE-GSP4. Ambos fragmentos fueron fusionados en una tercera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos flbE-PP1 y flbE-GSP4. Siguiendo esta metodología, se amplificaron los productos correspondientes a las mutaciones W11A, K51A, (D70A;D73A), (Y85A;V86A), y P182A, los cuales, fueron utilizados para transformar protoplastos de la cepa silvestre TN02A3 (tabla 2.1 y figura 2.4). La correcta integración de cada producto de PCR de fusión así como la presencia de la mutación deseada y ausencia de cualquier otra mutación en *flbE* fueron confirmadas mediante la técnica de *Southern-blot* y secuenciación, respectivamente. En estas reacciones de secuenciación se combinaron los oligonucleótidos empleados para insertar las mutaciones deseadas.

Para analizar el efecto de las mutaciones generadas en FlbE sobre la localización subcelular de FlbB, se generaron a partir del ADN genómico de los mutantes arriba descritos nuevos productos de fusión etiquetados con mRFP (*gpdA^{mini}::FlbE*::mRFP::pyrG^{Af}*). Para ello, se amplificaron nuevamente dos fragmentos. El primero contenía la región promotora, *gpdA^{mini}* y la secuencia mutante de *flbE*, y fue amplificado utilizando los oligonucleótidos flbE-PP1 y flbE-GSP2 (tabla 2.2). El segundo fragmento contenía la región correspondiente a mRFP, el marcador de selección (*pyrG^{Af}*) y la región terminadora de *flbE*, y fue amplificado utilizando los

oligonucleótidos flbE-GFP1 y flbE-GSP4. Cada producto de fusión fue utilizado para transformar alícuotas de protoplastos de la cepa BD630 (*gpdA^{mini}::GFP::FlbB::pyroA**) (tabla 2.1).

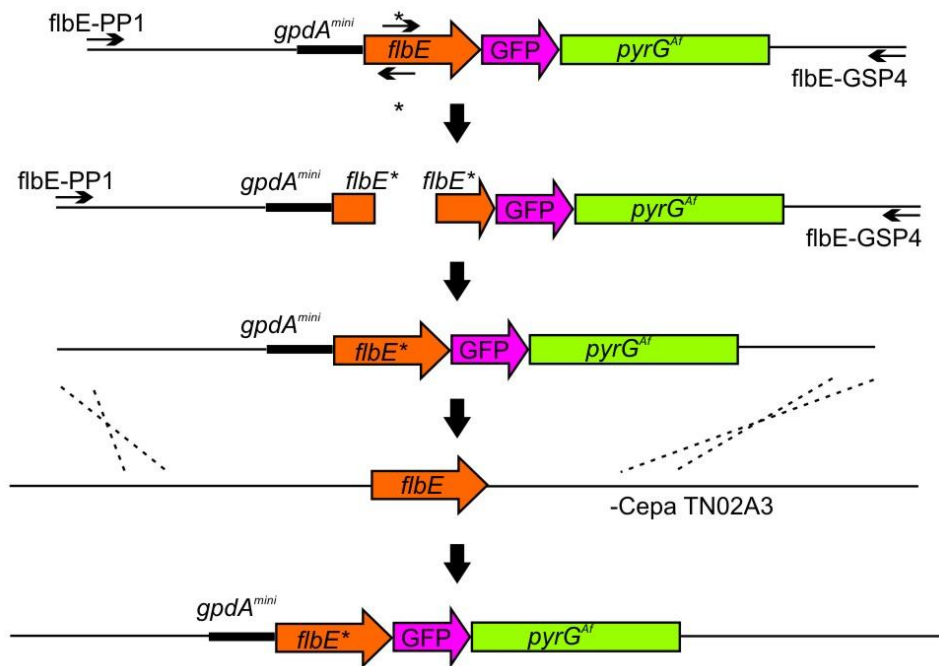


Figura 2.4: Mutagénesis dirigida de los dominios conservados en *flbE*. En dos reacciones independientes de PCR se amplificaron, por un lado, la región promotora, el promotor constitutivo *gpdA^{mini}* (en negro) y la región codificante de *flbE* hasta la mutación a insertar (en naranja) y, por el otro lado, el resto de *flbE* (en naranja), *GFP* (en rosa), el marcador de selección (*pyrG^{Af}*, en verde) y la región terminadora. Se utilizaron los pares de los oligonucleótidos flbE-PP1 y flbE*Dw o flbE*Up y flbE-GSP4, respectivamente. Tras la fusión de los fragmentos, el producto se utilizó para transformar protoplastos de la cepa silvestre TN02A3, induciendo la recombinación en el locus *flbE* (en naranja).

5.9 Fusión de *flbB::gfp* a distintos fragmentos de *flbE*

Se generaron tres cepas que expresaban bajo el promotor constitutivo *gpdA^{mini}* quimeras de FlbB::GFP fusionadas a distintos fragmentos correspondientes a FlbE (figura 2.5). Por un lado, se generaron las construcciones *gpdA^{mini}::FlbE⁽¹⁻³⁹⁾::FlbB::GFP::pyrG^{Af}* y *gpdA^{mini}::FlbE^(1-39,W11A)::FlbB::gfp::pyrG^{Af}*. Para ello, se amplificaron mediante PCR dos fragmentos (2 y 3 en figura 2.5) que contenían la región promotora de *flbE*, *gpdA^{mini}* y los primeros 39 codones de *flbE* (molde silvestre o aquel que incluía la mutación para la sustitución W11A). Se utilizaron los oligonucleótidos flbE-PP1 y FlbE-PSforFlbB-geneSP. Cada uno de estos fragmentos fue fusionado a un segundo fragmento que codificaba

FlbB::GFP::pyrG^{Af} (fragmento 4 en figura 2.5; oligonucleótidos FlbB-geneSP y FlbB-GFP2, y ADN de la cepa BD167 como molde) y un tercer fragmento que contenía la región 3'-UTR de *flbE* (fragmento 5 en figura 2.5A y B; oligonucleótidos FlbE-GSP3forFlbB-GFP2 y FlbE-GSP4, y ADN de una cepa silvestre como molde) (tablas 2.1 y 2.2). Por otro lado, se generó la construcción *gpdA^{mini}::FlbE⁽¹⁻²⁰²⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::gfp::pyrG^{Af}*, la cual incluía las secuencias genómicas completas de ambos genes. Para ello, se fusionó el fragmento con los promotores de *flbE* y *gpdA^{mini}* junto a la secuencia codificante entera de *flbE* (fragmento 1 en figura 2.4; oligonucleótidos FlbE-PP1 y FlbEfull-for-FlbB-geneSP, y ADN genómico de una cepa *gpdA^{mini}::FlbE::GFP::pyrG^{Af}*), con los fragmentos 4 y 5 de la figura 2.5. Para la generación de los productos de fusión se utilizaron los oligonucleótidos FlbE-PP1 y FlbE-GSP4. Alícuotas de protoplastos de la cepa *ΔflbB::riboB^{Af}* (BD177; tabla 2.1) fueron transformados con cada una de las construcciones generadas, induciendo la recombinación en el *locus flbE*. Así, el uso de este fondo genético garantizaba que la única fuente de FlbB y FlbE serían las quimeras generadas. Finalmente, se confirmó la correcta inserción de los fragmentos mediante *Southern-blot*, se comprobó el mantenimiento del marco de lectura entre FlbE y FlbB mediante secuenciación y la producción de quimeras del tamaño esperado mediante *Western-blot*.

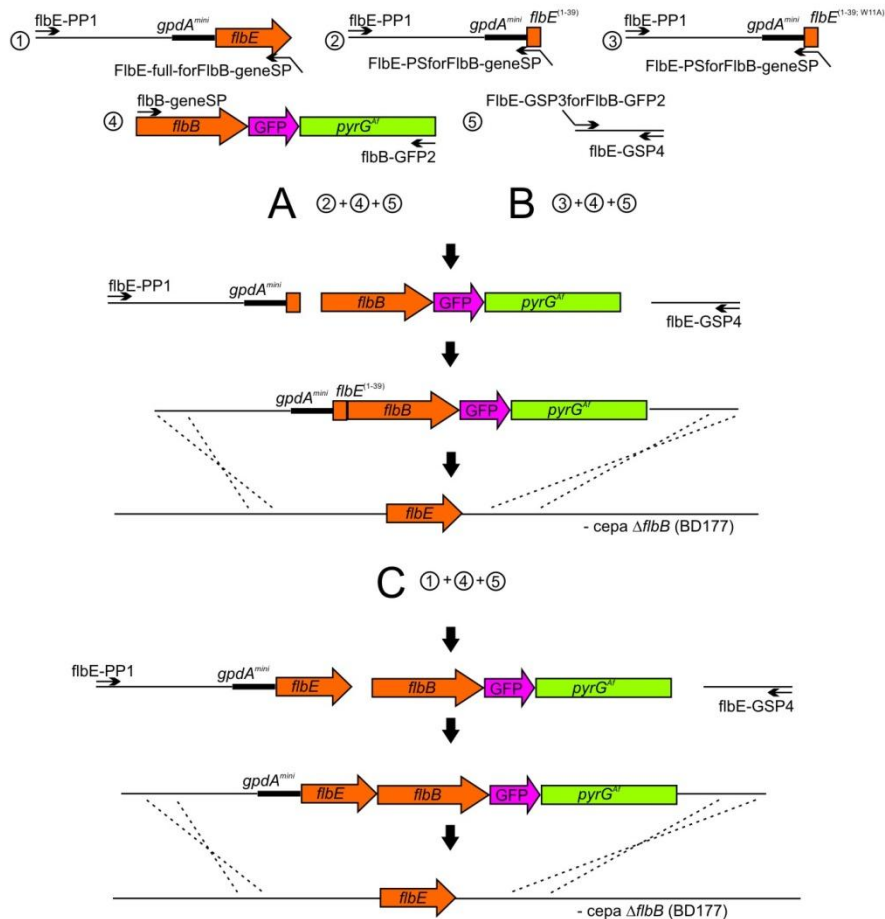


Figura 2.5: Generación de quimeras entre FlbB::GFP y diferentes regiones de FlbE. A) Se generó un *cassette* que contenía los primeros 39 codones de *flbE* seguido de *flbB::gfp::pyrG^{Af}* (en naranja los genes *flbB* y *flbE*, el epítipo GFP en rosa y el marcador de selección en verde) y la región 3'-UTR de *flbE*, todo ello bajo control del promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. **B)** Se generó la misma quimera pero con la mutación correspondiente a la sustitución W11A en FlbE. **C)** Se generó una tercera construcción que incluía la secuencia codificante de FlbE (codones 1-202) fusionada a *flbB::gfp::pyrG^{Af}*, también bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. Cada producto fue utilizado para transformar protoplastos de una cepa nula en *flbB*.

5.10 Etiquetados con el epítipo fotoconvertible Dendra2

Para la construcción de una cepa que expresara FlbB::Dendra2 bajo promotor nativo, se partió del plásmido *pGEM::^{5x}GA::Dendra2::pyrG^{Af}* (ver apartado 1.3), cuyo inserto fue obtenido por fusión de los fragmentos correspondientes a Dendra2 y *pyrG^{Af}*. Se amplificó el fragmento *Dendra2::pyrG^{Af}*, conteniendo extremos complementarios a la región 3' de *flbB* y el inicio de su región 3'-UTR, los cuales fueron amplificados por separado (ver apartado 5.1). El producto de fusión de los tres fragmentos se utilizó para transformar protoplastos de una cepa silvestre.

El ADN genómico de la cepa FlbB::Dendra2::pyrG^{Af} fue utilizado como molde para amplificar FlbB::Dendra2, introduciendo en sus extremos los sitios de restricción NcoI y EcoRI, respectivamente, los cuales fueron utilizados para la ligación en el plásmido pgpdA^{mini}::pyroA*. El plásmido pgpdA^{mini}::FlbB::Dendra2::pyroA* fue utilizado para transformar protoplastos de una cepa $\Delta flbB::riboB^{Af}$, induciendo la recombinación en el *locus pyroA* (ver apartado 5.7).

6. Técnicas de biología molecular para *Escherichia coli*

6.1 Medios de cultivo para *E. coli*

El medio de cultivo estándar para el cultivo de la bacteria *Escherichia coli* fue el medio LB (Luria-Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989), el cual contiene 10 g/L de Bactotripton, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl. El pH se ajustó a 7.5 con NaOH y se añadió 1 % de agar en el caso del medio sólido (esterilización en autoclave; 110 °C durante 20 minutos). Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina en una concentración de 100 µg/mL.

6.2 Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo mediante la técnica del choque térmico. Para ello, en un tubo de 1.5 mL, se añadieron 100 µL de células competentes de las cepas DH1 o DH5α y 1-2 µL de ADN. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 15 minutos, se incubó a 37 °C durante 2 minutos y se dejó otra vez en hielo durante 1 minuto. Después, se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó a 37 °C durante 1 h a 250 rpm. Finalmente, se inocularon volúmenes diferentes de la mezcla de transformación en placas de Petri de 90 mm que contenían medio LB suplementado con ampicilina. En el caso de las ligaciones, se concentró la mezcla de transformación y se inoculó toda la mezcla para obtener el mayor número de

transformantes posible y poder identificar al menos una colonia que tuviera el plásmido recombinante.

6.3 Extracción de ADN plasmídico

Para extraer el ADN plasmídico, se inoculó una alícuota de la colonia bacteriana a analizar en 10 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina. Se cultivó la mezcla a 37 °C durante 15 h a 250 rpm. La extracción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) para verificar la correcta extracción del plásmido.

6.4 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

La expresión de proteínas en *E. coli* se realizó a partir de células de la cepa DH1 previamente transformadas con el plásmido de expresión de interés. En primer lugar, se inoculó una colonia de la bacteria en 10 mL de medio LB suplementado con antibiótico y se cultivó durante 16 h a 37 °C y 220 rpm. Se diluyó entonces 1 mL de cultivo en un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de medio LB con antibiótico. Se incubó el cultivo nuevamente a 37 °C en agitación (220 rpm) hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.5-0.8. En este punto, se añadió IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) en una concentración final de 0.1 M y se incubó durante 24 h a 15 °C. Después, se centrifugó el cultivo y se resuspendió el precipitado en una solución que contenía PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, ajustado a pH=7.3) e inhibidores de proteasas (Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Se lisaron las células mediante sonicación (Labsonic® P., B. Braun Biotech) realizando 12 pulsos de 30 segundos cada uno. Finalmente, se centrifugaron las muestras durante 25 minutos a 14 000 rpm y 4 °C, y se separaron y almacenaron el precipitado

y el sobrenadante. Se realizó una electroforesis de poliacrilamida y posterior tinción con BioSafe™ *Coomassie* (G-250 Stain, Bio-Rad) para comprobar la expresión y solubilidad en fase acuosa de la fusión deseada.

7. Aislamiento y manipulación de proteínas de *Aspergillus nidulans*

7.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas de las distintas cepas de *Aspergillus nidulans* se llevó a cabo mediante tres métodos distintos, dependiendo del objetivo del experimento. El primer método se empleó cuando una quimera simplemente quería ser detectada por *Western-blot*, el segundo para obtener los extractos crudos a utilizar en ensayos de retención de proteínas (*Pull-down*) y el tercero para analizar la posible alquilación de las cisteínas de FlbB. Se describen brevemente los pasos a seguir en cada método de extracción.

❖ **Método 1, para *Western-blot***

Este protocolo parte de micelio cultivado en MFA y liofilizado, y fue descrito por Hervás-Aguilar y colaboradores (Hervás-Aguilar y Peñalva, 2010). Una vez homogeneizado (Mini-Beadbeater, Biospec), se separaron 6-7 mg de micelio y se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis (0.2 M NaOH y 0.2 % β -mercaptoetanol (v/v) en agua). Después, se mezcló vigorosamente y se añadió TCA al 7.5 % (p/v), precipitando así las proteínas. Se incubaron las mezclas en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, 2 veces para eliminar bien el TCA. Sobre el *pellet* se añadieron 100 μ L de Tris Base (1 M) y 200 μ L de tampón de carga (62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 2 % SDS (p/v), 5 % β -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea y 0.05 % azul de bromofenol (p/v)). Se mezclaron bien las muestras mediante agitación por *vortex*, se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos y se

centrifugaron durante 1 minuto a velocidad máxima antes de cargarlas en un gel de SDS-poliacrilamida.

❖ **Método 2, para Pull-down**

Este protocolo fue descrito por Fernández-Martínez y colaboradores (Fernández-Martínez *et al.*, 2003). Se partió de 200-250 mg de micelio liofilizado proveniente de un cultivo en MFA (tabla 2.3). Tras pulverizar la muestra, se añadió 1 mL de tampón de extracción de proteínas NP-40 (5 mM HEPES pH=7.5 (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 0.1 % NP-40 (p/v) (Thermo Scientific), 0.5 mM DTT y una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche)) y se mezcló. Las muestras se incubaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 1.5 h. Después, se centrifugaron durante 30 minutos a 14 000 rpm y 4 °C, recogiendo el sobrenadante y midiendo la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

En base a la concentración medida, se precipitaron 200 µg de extracto de proteína añadiendo TCA al 10 % (p/v) e incubando durante 10 minutos en hielo. Tras ello, se centrifugaron los tubos a 14 000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se realizaron sucesivamente dos limpiezas con mezclas de etanol y éter etílico en proporciones 1:1 y 1:3, respectivamente. Una vez eliminado el sobrenadante mediante vacío, se añadieron 80 µL de tampón de carga y la preparativa de las muestras para cargar en un gel de SDS-poliacrilamida se realizó según lo descrito en el método 1.

❖ **Método 3 para alquilación de proteínas**

Este protocolo ha sido adaptado para el hongo *Aspergillus nidulans* a partir de los procedimientos desarrollados para *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* por diferentes grupos (Delaunay *et al.*, 2000; Vivancos *et al.*, 2004). Se obtuvieron 3 tipos de

muestras distintas: un extracto crudo inicial donde el estado oxidativo de las proteínas había sido aislado, una segunda muestra en la que el extracto proteico había sido incubado en una solución de alquilación para las cisteínas y una tercera en la que, además de la alquilación, se había procedido con la desfosforilación de las proteínas.

Para ello, se inocularon 10^6 conidios/mL en un matraz que contenía 30 mL de MMA con los suplementos correspondientes. Tras cultivar durante 18 h, se transfirió una alícuota de 1 mL a un tubo de 1.5 mL. Después, se añadieron 100 μ L de TCA al 100 % (p/v) y se centrifugaron las muestras a 4 000 rpm y 4 °C durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante mediante vacío y se resuspendió el precipitado en 1 mL de TCA al 20 % (p/v). Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 13 200 rpm y 4 °C, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500 μ L de TCA al 12.5 % (p/v). Se añadieron bolas de vidrio de 425-600 μ m de diámetro (Sigma-Aldrich) y se lisaron las células mediante 2 pulsos de 5 segundos en un homogeneizador (Mini-Beadbeater, Biospec). Para recoger la fase líquida, se hizo un agujero en la base del tubo y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 2 mL centrifugando brevemente. Tras ello, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 4 °C y 13 200 rpm. El sobrenadante se eliminó mediante vacío y el precipitado se resuspendió en 1 mL de acetona. En este paso es necesario disgregar el precipitado con la punta de un asa bacteriológica (Scharlab) durante 30 segundos por muestra, mezclando vigorosamente al final. Después, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 4 °C y 13 200 rpm. El sobrenadante se eliminó por vacío y se secaron las muestras a 55 °C durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 60 μ L de tampón de carga (50 % glicerol (v/v), 10 % SDS (p/v), 0.25 mM Tris-HCl pH=6.8, 0.5 M DTT, 0.25 % azul de bromofenol (p/v)) y se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Para los experimentos de alquilación de cisteínas, en vez de añadir el tampón de carga se añadieron 50 μ L de tampón de alquilación (0.1 M Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA, 1 % SDS

(p/v) y 75 mM del alquilante yodoacetamida (0.014 mg/mL) (Sigma-Aldrich)) y se disgregó el precipitado durante 1 minuto. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 15 minutos y por último se añadieron 60 µL de tampón de carga sin DTT (50 % glicerol (v/v), 10 % SDS (p/v), 0.25 mM Tris-HCl pH=6.8 y 0.25 % azul de bromofenol (p/v)), ya que éste es un agente reductor. Antes de cargar las muestras en el gel de SDS-poliacrilamida, se calentaron durante 5 minutos a 100 °C.

Para los experimentos de desfosforilación, se añadieron a 10 µL de extracto precipitado en TCA, 40 µL de tampón de dilución AP (0.1 M Tris-HCl pH=9.5 y 0.1 mM EDTA en agua) y 0.1 µL de fosfatasa aislada de gamba (*Shrimp*, Sigma-Aldrich). Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37 °C. Después, se realizó la alquilación, tal y como se ha descrito previamente y finalmente se añadieron 60 µL de tampón de carga sin DTT. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 100 °C y se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida.

7.2 Inmunodetección de proteínas (*Western-blot*)

Una vez obtenidos los extractos proteicos se realizó la separación de los mismos mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida, SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989). Tras desnaturizar las muestras (ver apartado anterior), cada una se cargó en dos geles al 10 % (sistema Mini-PROTEAN® 3, Bio-Rad; (Laemmli, 1970)), uno para analizar la integridad de los extractos proteicos, el cual se tiñó con Bio-Safe™ *Coomassie*, y el segundo para la transferencia a una membrana de PVDF (Trans-blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad), en la cual se detectaron los epítomos correspondientes. Dichos epítomos se detectaron mediante la hibridación primero con anticuerpos primarios específicos y, tras ello, con anticuerpos secundarios adecuados conjugados a la peroxidasa de rábano (tabla 2.8). La actividad peroxidasa se indujo mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL

(Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad) y la imagen de la reacción se capturó con el dispositivo ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron mediante el software de libre acceso ImageLab (versión 5.1, Bio-Rad).

Tabla 2.8: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la detección de epítopos unidos a proteínas de *A. nidulans*.

ANTICUERPOS		DILUCIÓN	FUENTE	REFERENCIA
Primarios	α-GFP	1/1 000	Ratón	Roche
	α-HA	1/1 000	Ratón	Santa Cruz
	α-HxQ	1/30 000	Conejo	AB1807 Chemicon Intemat Inc.
Secundarios	α-ratón IgG	1/2 500	Cabra	Jackson ImmunoResearch Laboratories INC
	α-conejo	1/10 000	Asno	Sigma-Aldrich

7.3 Ensayos de retención de proteínas (*Pull-Down*)

Los experimentos de *Pull-Down* se realizaron para determinar una posible interacción entre dos proteínas de interés. Para ello, se utilizaron proteínas de fusión a GST expresadas en *E. coli* y extractos proteicos totales de *A. nidulans* (apartado 7.1, método 2), en los cuales, la proteína a analizar estaba etiquetada con un epítipo adecuado.

En primer lugar, se añadieron 60 µL de resina glutatión sefarosa (GE Healthcare) en un tubo de 1.5 mL y se realizaron dos lavados con 200 µL PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, ajustada a pH=7.3, GE Healthcare) que incluía inhibidores de proteasas (Roche). Tras ello, se añadieron 400 µL de extracto de *E. coli* (apartado 6.4) y se incubó la mezcla durante 1 hora a 4 °C en un agitador rotatorio. Una vez unida la quimera de GST a la resina, se realizaron tres lavados con 200 µL de PBS con inhibidores de proteasas y 0.5 % de Tritón™ X-100 (v/v) (Roche), con el objetivo de eliminar las proteínas de *E. coli* que no se hubieran unido a la resina. La incubación con 2 mg de extracto proteico de *A. nidulans* se extendió durante 40 minutos, tras los cuales, se realizaron cuatro lavados con 200 µL de PBS con inhibidores de proteasas y 0.5 % de Tritón™ (v/v). Finalmente, la resina con la fusión a GST

y el resto de proteínas unidas supuestamente de forma específica fueron resuspendidas en 30 μ L de tampón de carga. Las muestras resultantes (fracción retenida) se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y *Western-blot* (apartado 7.2), comparándolas con las fracciones no retenidas (recogidas en los lavados con PBS y precipitadas con TCA).

8. Microscopía de fluorescencia

La localización subcelular de proteínas de *A. nidulans* se analizó utilizando uno de los siguientes microscopios:

- ❖ Microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1 equipado con una lente de inmersión en aceite (63x, Plan Aplanachromat), una cámara AxioCam MRm Rev.3, una fuente de luz externa Zeiss HXP 120C para los experimentos de epifluorescencia y los filtros verde (filtro 38 HE, excitación 470/40; emisión 525/50), rojo (filtro 43 HE, excitación 545/25; emisión 605/70) y DAPI (filtro 49; excitación 365 nm; emisión 445 nm). Este microscopio incluía un diafragma para la radiación de regiones específicas en las muestras, el cual se utilizó en el análisis de la dinámica de la fusión FlbB::Dendra2.
- ❖ Microscopio invertido Leica (DMI 6000B) equipado con una lente de inmersión en aceite (63x, Plan Apo 1.4 N.A., Leica) y dotado de filtros verde (excitación 470 nm; emisión 525 nm), rojo (Txred, excitación 562 nm; emisión 624 nm) y DAPI (D, excitación 355 nm; emisión 470 nm) para GFP y Cherry-Red o inducir la fotoconversión de Dendra2, respectivamente. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital ORCA-ER II (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ).

Para el análisis se inocularon, en placas individuales (Ibidi, Cat. No. 81151) o de 8 pocillos (Ibidi, Cat. No. 80821), 3 mL o 300 μ L por pocillo de WMM (tabla 2.3) y los suplementos necesarios, y 40 μ L de una suspensión de conidiosporas en Tween® 20 al 0.02 % (v/v). Se incubaron las muestras durante 16 h a 25 °C. La asociación de la localización de FlbB

con diferentes elementos del citoesqueleto se analizó según lo descrito en (Araujo-Bazán *et al.*, 2008), añadiendo medio fresco con 100 μ M de Latrunculina B (Calbiochem®) y/o 2.4 μ g/mL de Benomilo (Sigma-Aldrich).

El análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio se realizó mediante el software de libre acceso ImageJ (versión 1.47v; imagej.nih.gov/ij, U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Las gráficas monodimensionales muestran la variación de la fluorescencia verde o roja a lo largo de las regiones indicadas, permitiendo el cálculo de la relación entre la intensidad de la fluorescencia de la punta y el núcleo apical. Para realizar este cálculo se analizaron al menos 10 hifas de cada cepa y la significancia estadística de las diferencias observadas entre las distintas cepas se determinó utilizando la función prueba t (dos colas) (Office Excell, Microsoft).

9. Herramientas bioinformáticas

Las distintas secuencias analizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de las bases de datos Aspergillus Genome Database (www.aspgd.org/) o Broad Institute (www.broadinstitute.org/). Las construcciones genómicas y plasmídicas generadas se diseñaron utilizando el programa Vector NTI (Invitrogen). Finalmente, las comparaciones entre las secuencias procedentes de las reacciones de secuenciación y las de referencia se realizaron utilizando el algoritmo Lalign (embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html).

CAPÍTULO 3: Dinámica subcelular de FlbB entre la punta y los núcleos de las hifas vegetativas

1. Introducción

La función de los factores UDA es esencial para la inducción del desarrollo asexual. El mecanismo de transducción en el que participan es activo en hifas vegetativas y su correcto funcionamiento depende de la maquinaria que controla el crecimiento de éstas. La localización subcelular de FlbB es el ejemplo más claro que sustenta esta afirmación, ya que, este FT se localiza en la punta de las hifas vegetativas a través de un mecanismo FlbE- y actino-dependiente (Garzia *et al.*, 2009). Sin embargo, su localización nuclear está limitada a los núcleos más apicales (Etxebeste *et al.*, 2008) y depende de FlbD (Oiartzabal-Arano, 2016), con quien se coordina para inducir la expresión de *brlA* (Garzia *et al.*, 2010). La expresión de una quimera GFP::FlbB bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}* causa la inhibición del gradiente de localización nuclear de FlbB y el FT se localiza en todos los núcleos de las hifas vegetativas. En ausencia de *flbE*, FlbB pierde la localización apical y, aunque se acumula en los núcleos, también pierde la capacidad de activar la expresión de *brlA* y con ello la de conidiar (Herrero-García *et al.*, 2015). Ello sugiere que existe una direccionalidad en la localización subcelular de FlbB, teniendo que pasar por la punta de la hifa para adquirir la capacidad de ser transcripcionalmente activo en el núcleo. Por lo tanto, parece haber una relación funcional entre las poblaciones apical y nuclear de FlbB. El objetivo de este capítulo ha sido confirmar dicha direccionalidad en la dinámica de FlbB y la existencia de un mecanismo de migración desde la punta al núcleo. Además, se ha revisado la dependencia de la localización apical con respecto a los filamentos de actina y el papel que la miosina *myoE^{myoV}* podría tener en el transporte de FlbB entre el subápice y el ápice.

2. Transporte acropetal de FlbB

2.1 Papel de los citoesqueletos de tubulina y actina en el transporte acropetal de FlbB

Para confirmar la localización apical actino-dependiente de FlbB (Garzia *et al.*, 2009) y ampliar el conocimiento sobre su dinámica acropetal, se aprovecharon los mayores niveles de la quimera GFP::FlbB generados al expresarla bajo promotor $gpdA^{mini}$ y se analizó su localización subcelular en medio líquido que contenía latrunculina B y/o benomilo. Mientras que la latrunculina despolimeriza los filamentos de actina, el benomilo causa la despolimerización de los microtúbulos (Araujo-Bazán *et al.*, 2008). La exposición de las células a la latrunculina B inhibió la localización apical de FlbB. Este efecto se observó desde los primeros minutos de la aplicación de la droga, quedando FlbB acumulado en la región subapical (ver las ampliaciones y los gráficos de la intensidad fluorescente en las áreas indicadas en la figura 3.1A, izquierda).

La adición de benomilo al medio de cultivo no alteró la localización apical de FlbB, tal y como se había descrito previamente (Garzia *et al.*, 2009) (figura 3.1A, derecha). Sin embargo, estos resultados no aclaraban si una fracción de FlbB continuaba en el ápice porque estaba ahí antes de la adición de la droga o porque el benomilo no afectaba a su transporte acropetal. Por consiguiente, se expusieron las hifas de la misma cepa a ambas drogas simultáneamente durante 30 minutos. Este hecho provocó la pérdida de la localización apical de FlbB y el crecimiento isotrópico de la punta (figura 3.1B, izquierda). Después, se retiró el medio y se añadió medio fresco que contenía únicamente benomilo. En estas condiciones, FlbB volvió a acumularse en la punta (figura 3.1B, derecha).

La expresión de GFP::FlbB bajo promotor constitutivo también permitió el seguimiento de agregados de FlbB moviéndose en dirección acropetal y basipetal (figura 3.1C y los quimogramas correspondientes en la figura 3.1D). Sin embargo, este movimiento, y en

consecuencia la acumulación apical, estaban casi totalmente inhibidos en un fondo genético $\Delta flbE$ (Herrero-García *et al.*, 2015).

Estos resultados sugieren que los filamentos de actina son esenciales para el transporte de FlbB desde el subápice hasta el ápice, mientras que los microtúbulos no parecen tener un papel esencial en este transporte.

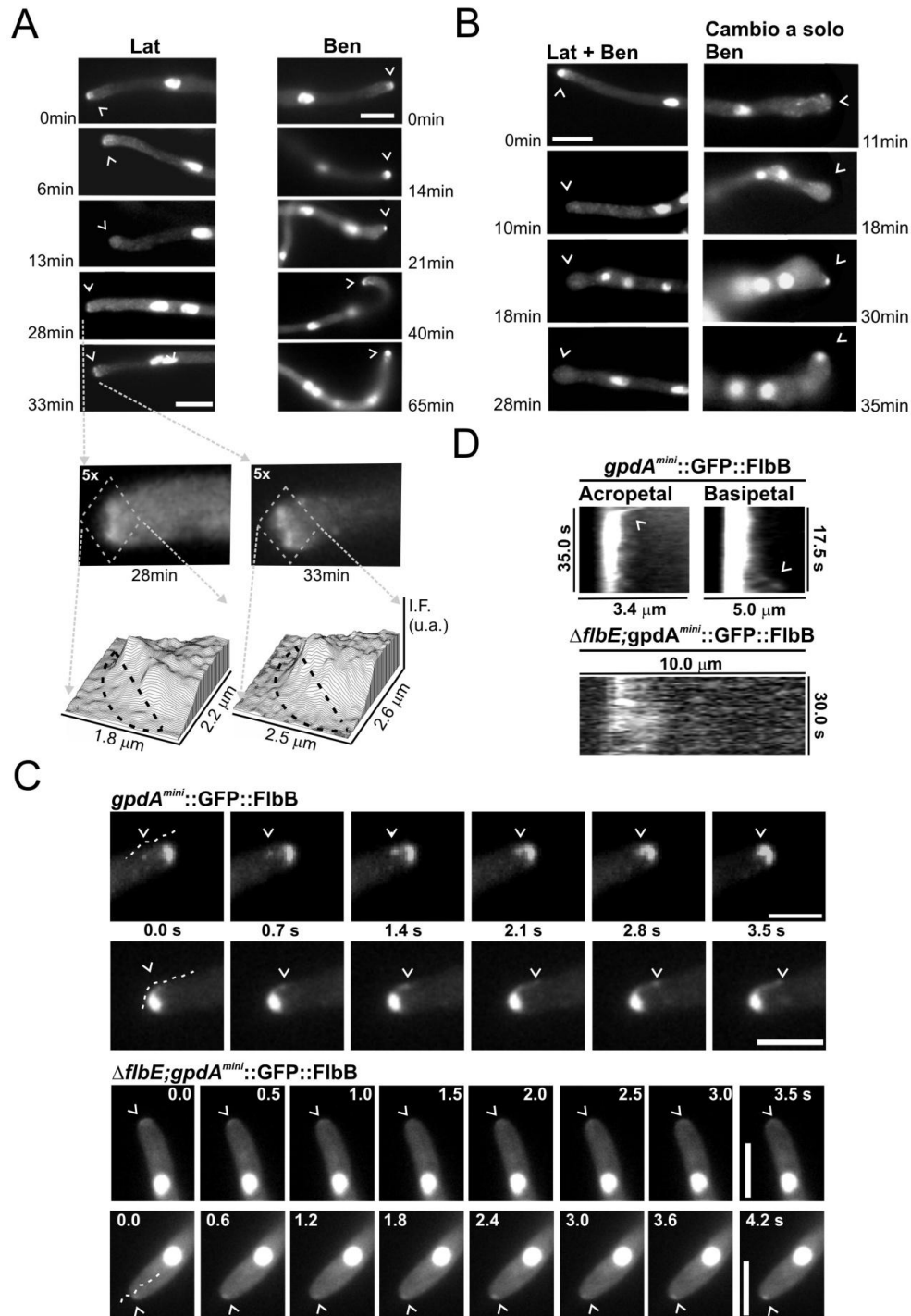


Figura 3.1: Papel de los citoesqueletos de actina y tubulina en la migración de FlbB al ápice. **A)** Localización de la quimera GFP::FlbB, expresada bajo el promotor $gpdA^{mini}$, en MMA que contiene 100 μ M de latrunculina B (izquierda) o 2.4 μ g/mL de benomilo (derecha). Las ampliaciones (5x) y los gráficos de la intensidad fluorescente en las superficies señaladas muestran la acumulación subapical de FlbB causada por la adición de latrunculina B. Barra de escala: 5 μ m. **B)** Localización de GFP::FlbB en células de la misma cepa cultivadas en MMA que contiene ambas drogas (izquierda) o después del cambio a MMA que únicamente contiene benomilo (derecha). Barra de escala: 5 μ m. **C)** La secuencia de imágenes superior muestra agregados de GFP::FlbB (puntas de flecha), expresado bajo control del promotor $gpdA^{mini}$, moviéndose en dirección acropetal (arriba) y basipetal (abajo) en un fondo genético silvestre. En la secuencia inferior se muestra la ausencia de movimiento de la misma quimera en un fondo genético $\Delta flbE$. En este caso, las puntas de flecha señalan el ápice de las hifas analizadas. Barra de escala en todos los casos: 5 μ m. Las líneas discontinuas indican las regiones analizadas en los quimogramas del panel **D**.

2.2 Efecto de la ausencia de actividad miosina V/MyoE en la localización apical de FlbB

Primero, y a modo de control, se analizó la dinámica de la quimera GFP::FlbB en una cepa que expresaba tanto ésta como FlbE::mRFP bajo control del promotor constitutivo $gpdA^{mini}$. La expresión constitutiva de ambas quimeras aumenta significativamente la cantidad de FlbB acumulado en el ápice (ver capítulo 5), por lo que esta cepa resultaba adecuada para volver a analizar el movimiento acropetal y basipetal de FlbB. Se detectaron agregados de FlbB moviéndose en ambas direcciones (números 1 y 4 en la figura 3.2A y las puntas de flecha en el quimograma del panel inferior). Se observó también un agregado inmóvil desde el cual partían otros en dirección basipetal (número 2 y 4 en la figura 3.2A; ver quimograma). A medida que la intensidad fluorescente disminuía como resultado de la exposición a la luz incidente, se comenzaron a observar estructuras filamentosas entre el subápice y el ápice, las cuales, podrían corresponder a filamentos de actina marcados con GFP::FlbB (número 3 en la figura 3.2A).

La miosina V, MyoE, participa en el transporte de cargos entre subápice y ápice (Pantazopoulou *et al.*, 2014; Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Así, se generó un mutante $\Delta myoE$ que expresaba la quimera GFP::FlbB bajo promotor nativo. Se observó que FlbB se dispersaba 1) describiendo una media luna que seguía la forma de la hifa en la punta (figura 3.2B, segunda línea) o 2) formando dos agregados a ambos lados del ápice (figura 3.2B, tercera línea). Estos

resultados sugieren que el transporte de FlbB desde el subápice al ápice tiene lugar a través de filamentos de actina y que *myoE* puede ser necesario en dicho transporte.

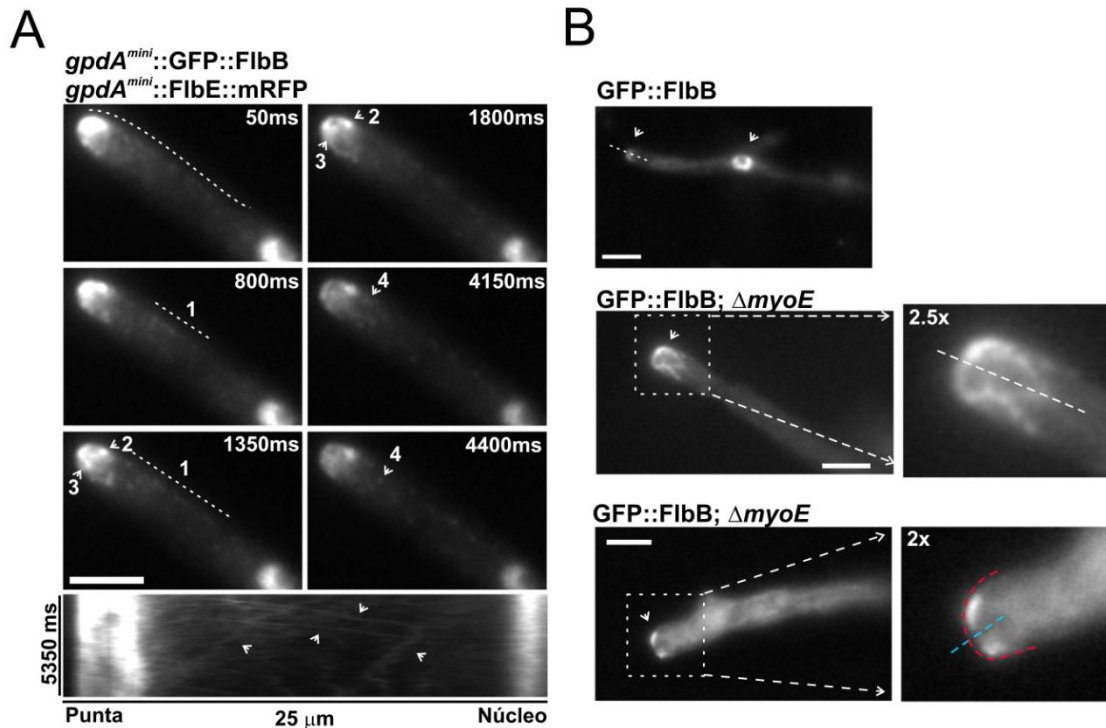


Figura 3.2: Efecto de la ausencia de actividad miosina V en la localización subcelular de FlbB. **A)** Dinámica de GFP::FlbB en hifas vegetativas de una cepa que co-expresa FlbE::mRFP, ambas bajo el promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. Se muestran 6 fotogramas de un mismo análisis. La línea de puntos suspensivos en el primer fotograma indica la región analizada en el quimograma inferior, el cual muestra agregados de GFP::FlbB moviéndose en dirección acropetal y basipetal entre la punta y el núcleo apical (números 1 y 4). El número 2 indica un agregado de GFP::FlbB desde donde parten otros en dirección basipetal (indicados con el número 4 en los fotogramas correspondientes a 4150 y 4400 ms). Finalmente, el número 3 indica estructuras filamentosas que parecen enlazar el subápice y el ápice. Barra de escala: 5 μ m. **B)** Localización subcelular de la quimera GFP::FlbB en un fondo genético silvestre (primera fila) y en un fondo Δ *myoE*/*myoV* (segunda y tercera fila). La delección de *myoV* causa una deslocalización de GFP::FlbB del ápice, dispersándose según una forma de media luna que sigue la curvatura de la hifa en la punta (segunda fila) o formando dos agregados a ambos lados del ápice (tercera fila). Barra de escala en todos los paneles: 5 μ m.

3. Transporte basipetal de FlbB

GFP::FlbB, expresado bajo control de *gpdA^{mini}*, pierde su localización apical en un fondo genético nulo de *flbE*, pero no la nuclear, aunque dicha población nuclear no es capaz de activar la transcripción de *brlA* (Herrero-García *et al.*, 2015). Por consiguiente, se puede proponer la necesidad de que FlbB pase previamente por la punta para que sea transcripcionalmente activo en el núcleo. Es decir, debería haber una migración de FlbB desde

la punta a los núcleos. En este apartado se ha utilizado el etiquetado de FlbB con el epítipo fotoconvertible Dendra2 para comprobar dicha migración.

3.1 Puesta a punto del sistema FlbB::Dendra2

Dendra2 es una proteína fotoconvertible verde que al ser irradiada con luz de longitudes de onda específicas cambia a color rojo (figura 3.3) (Chudakov *et al.*, 2007a). La disponibilidad comercial de Dendra2 (Clontech) y sus características han permitido el estudio de la dinámica subcelular de proteínas en eucariotas superiores y en levaduras (Chudakov *et al.*, 2007b; Jasik *et al.*, 2013; Onischenko *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2013).

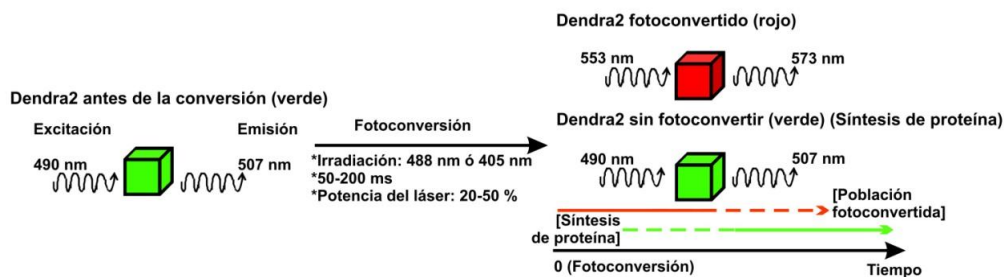


Figura 3.3: Fotoconversión de Dendra2. Antes de la fotoconversión, se puede analizar la localización de la proteína etiquetada con Dendra2 siguiendo la fluorescencia verde. Para la fotoconversión, se irradia toda la célula o la región de interés (*ROI: region of interest*) con un láser a 405 nm o 488 nm (tiempo de exposición entre 50-200 ms; potencia del láser entre 20-50 %; deben ajustarse las condiciones óptimas para cada sistema). Tras la fotoconversión, se pueden analizar cambios en la localización de la forma fotoconvertida (población con fluorescencia roja) o los tiempos de recuperación de la fluorescencia verde, la cual, indica la síntesis de la proteína objeto de estudio. Modificado a partir de (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014).

Al ser ésta la primera vez que se utilizaba este epítipo fotoconvertible en *Aspergillus nidulans*, se procedió con la puesta a punto de la técnica y los parámetros de análisis. En primer lugar, se generaron cepas que expresaban quimeras FlbB::Dendra2 bajo promotor nativo o promotor *gpdA^{mini}* (ver apartado 5.10 del capítulo 2). Para confirmar la funcionalidad de las construcciones, se analizó la producción de conidios por unidad de área en cada cepa generada (*flbB^(p)::FlbB::Dendra2* y *gpdA^{mini}::FlbB::Dendra2*) y las cepas parentales correspondientes (una cepa silvestre, TN02A3 (Nayak *et al.*, 2006), y el mutante nulo de *flbB*

(Garzia *et al.*, 2010), respectivamente) (figura 3.4). Las secuenciaciones realizadas demostraron que las construcciones generadas no contenían mutaciones en las secuencias de *flbB* o *Dendra2*. Por lo tanto, se esperaba que las cepas tuvieran una producción de conidios y un fenotipo similar en comparación con la cepa silvestre. Una producción significativamente menor de conidios supondría la pérdida de función de FlbB. La figura 3.4 (paneles A y B) muestra que no hay una variación significativa en la producción de conidios por cm^2 al comparar las cepas *flbB*^(p)::FlbB::Dendra2 y su parental silvestre o *gpdA*^{mini}::FlbB::Dendra2 y *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB (se utilizaron tres réplicas para cada cepa; $p > 0.01$ en las dos comparaciones; cambio no significativo). Por lo tanto, las cepas generadas contenían secuencias funcionales de FlbB.

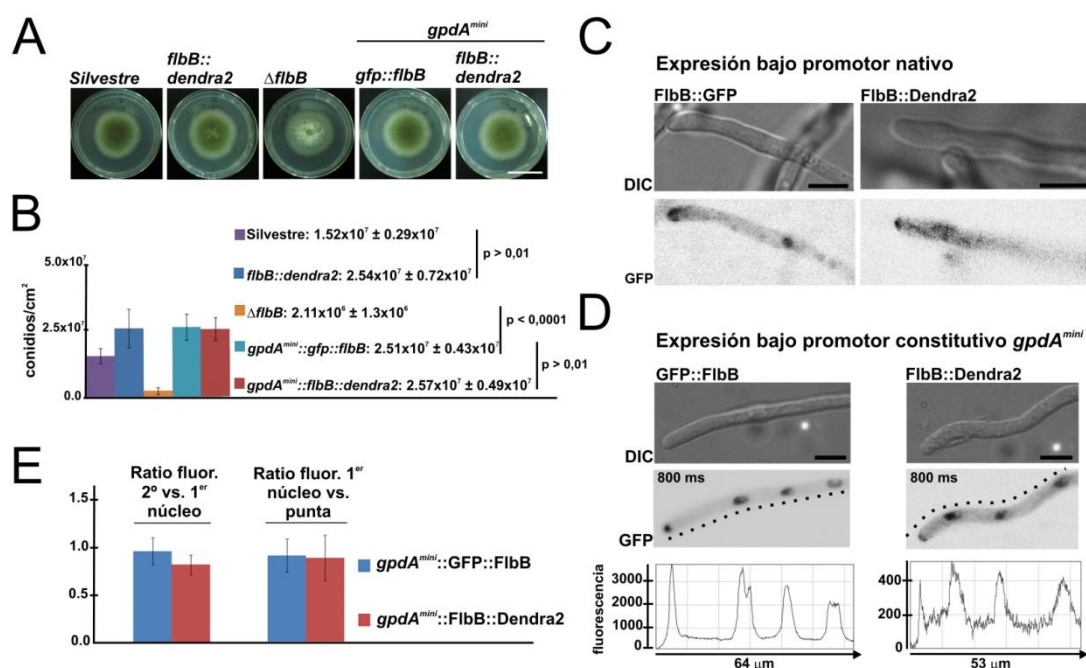


Figura 3.4: Evaluación de la funcionalidad de las construcciones *flbB::dendra2* generadas. **A)** Fenotipos de las cepas generadas en comparación con los parentales TN02A3 (Nayak *et al.*, 2006) y BD177 (Garzia *et al.*, 2010) tras 72 horas de cultivo a 37 °C en MMA. Barra de escala: 2 cm. **B)** Producción de conidios de cada cepa del panel A. Los valores son un promedio de tres réplicas más el error estándar de la media (*s.e.m.*: *standard error of the mean*). Valores de p menores de 0.01 se consideran cambios significativos. **C)** Localización subcelular de FlbB::GFP (Etxebeste *et al.*, 2008) y FlbB::Dendra2 cuando ambas quimeras se expresaban bajo el promotor nativo. Barra de escala: 5 μm . **D)** Localización subcelular de GFP::FlbB y FlbB::Dendra2 cuando ambas quimeras se expresaban bajo el promotor constitutivo *gpdA*^{mini}. Barra de escala: 5 μm . Los gráficos inferiores muestran la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la región indicada por las líneas discontinuas. **E)** Ratios entre la intensidad de la fluorescencia del segundo y el primer núcleo (apical), por un lado, y el núcleo apical y la punta, por el otro lado. Los valores corresponden a la media obtenida a partir del análisis de diez hifas para cada cepa más *s.e.m.* Los colores azul y rojo corresponden a las cepas *gpdA*^{mini}::GFP::FlbB y *gpdA*^{mini}::FlbB::Dendra2, respectivamente.

En segundo lugar, deben tenerse en cuenta, por un lado, la baja intensidad de la fluorescencia verde de Dendra2 en comparación con la de GFP (ver el enlace www.clontech.com/OA_MEDIA/xxclt_media/MainWP063553.html) y por el otro lado, la baja expresión de *flbB* en hifas vegetativas. Por ello, se comparó la intensidad de la fluorescencia de las distintas construcciones de FlbB::Dendra2 generadas con respecto a la de FlbB::GFP, para poder seleccionar así la cepa apropiada para los experimentos de fotoconversión. Cuando se expresaba bajo su promotor nativo, FlbB::GFP se detectó en la punta y en el núcleo apical principalmente (figura 3.4C, izquierda) (Etxebeste *et al.*, 2008). Sin embargo, FlbB::Dendra2 apenas se detectaba en la punta y en ningún caso fue detectado en el núcleo apical (figura 3.4C, derecha), por lo que se descartó la cepa correspondiente para los análisis de fotoconversión.

Cuando FlbB::Dendra2 se expresaba bajo el promotor constitutivo *gpdA^{mini}*, la quimera mostró la misma distribución subcelular (canal verde) que la descrita para la cepa *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* (figura 3.4D), siendo detectado en la punta y en todos los núcleos a lo largo de la hifa. La intensidad de la fluorescencia para FlbB::Dendra2 era 8.4 ± 0.9 veces más baja que para GFP::FlbB (el promedio y la desviación estándar se obtuvieron considerando la fluorescencia de la punta y los tres primeros núcleos, figura 3.4D, N = 10 hifas, $p < 0.0004$ en los cuatro puntos seleccionados, diferencia significativa). Sin embargo, la distribución de FlbB en la punta y los núcleos era similar en las dos cepas, ya que el ratio entre la intensidad de la fluorescencia en la punta y el núcleo apical (0.91 ± 0.18 para GFP::FlbB y 0.89 ± 0.24 para FlbB::Dendra2), o entre la del segundo núcleo y el primero (0.96 ± 0.14 para GFP::FlbB y 0.82 ± 0.10 para FlbB::Dendra2) no varió significativamente (N = 10 hifas para cada cepa; $p > 0.01$ en ambas comparaciones; diferencia no significativa) (figura 3.4E). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió utilizar la cepa *gpdA^{mini}::FlbB::Dendra2* en los experimentos de fotoconversión.

En tercer lugar, se evaluaron los valores de los parámetros a tener en consideración a la hora de fotoconvertir Dendra2 de su forma verde a la roja. Debe tenerse en cuenta que en este trabajo no se utilizó un laser para dicha fotoconversión sino un filtro para DAPI (Baker *et al.*, 2010; Vorvis *et al.*, 2008). Se analizó el efecto que tienen la intensidad de la luz UV utilizada (100 %, 80 %, 60 % y 40 % del máximo posible) y el tiempo de radiación (2 500, 5 000 y 7 500 ms en cada intensidad) sobre la fotoconversión de FlbB::Dendra2, así como en el crecimiento del hongo. Se analizaron 4 hifas en cada condición, determinándose los promedios (más *s.e.m*) de la disminución de la intensidad de la fluorescencia verde y el aumento de la fluorescencia roja en la punta (tabla 3.1). Para ello, se adquirieron imágenes en ambos canales antes y después de la fotoconversión, y también 5 y 10 minutos después de ésta; en este caso, para determinar el efecto de la radiación sobre el crecimiento.

Tabla 3.1: Análisis del efecto de la intensidad de la radiación UV y el tiempo de exposición (ms) en la fotoconversión de Dendra2. Se realizaron las medidas tomando como referencia las puntas de las hifas vegetativas. Los valores representan los promedios de la disminución de la intensidad de la fluorescencia verde (GF) y del aumento de la intensidad de la fluorescencia roja (RF) más el error estándar de la media (*s.e.m.*). Se analizaron 4 hifas para cada condición (ver también figura 3.5). Se indica asimismo si las condiciones ensayadas inhiben o no el crecimiento vegetativo.

Tiempo de exposición (ms)	2 500			5 000			7 500		
	Dismin. de GF (%)	Aumento de RF (%)	Inhibic. crecimi.	Dismin. de GF (%)	Aumento de RF (%)	Inhibic. crecimi.	Dismin. de GF (%)	Aumento de RF (%)	Inhibic. crecimi.
100 %	45 ± 10	737 ± 398	Si	63 ± 3	667 ± 117	Si	67 ± 6	914 ± 374	Si
80 %	52 ± 1	877 ± 111	No	62 ± 10	805 ± 216	Si	58 ± 9	1 298 ± 158	Si
60 %	40 ± 15	433 ± 301	No	33 ± 11	360 ± 47	Si	54 ± 3	463 ± 277	Si
40 %	27 ± 20	161 ± 60	No	31 ± 7	209 ± 21	No	22 ± 10	289 ± 154	Si

El crecimiento de las hifas se inhibió a intensidades de luz y tiempos de exposición elevados (tabla 3.1; ver también figura 3.5). A la máxima intensidad de la lámpara (100 %) se inhibió el crecimiento en los tres tiempos de exposición analizados (2 500, 5 000 y 7 500 ms) (figura 3.5A). La eficiencia de la fotoconversión fue similar al utilizar una intensidad de lámpara del 80 % en comparación con la intensidad máxima (tabla 3.1; figura 3.5B). Sin embargo, se observó que al utilizar 2 500 ms de exposición no había inhibición del crecimiento, mientras que a mayores tiempos de exposición sí la había. Al reducir la intensidad de la lámpara al 60 %

o 40 % del máximo, la eficiencia de la fotoconversión disminuía claramente (tercera y cuarta fila de la tabla 3.1; ver anexo 1). Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció la intensidad de la lámpara al 80 % de la intensidad máxima y el tiempo de exposición en 2 500 ms, ya que en estas condiciones no se inhibía el crecimiento de las hifas mientras que se obtenía una fotoconversión lo suficientemente eficiente.

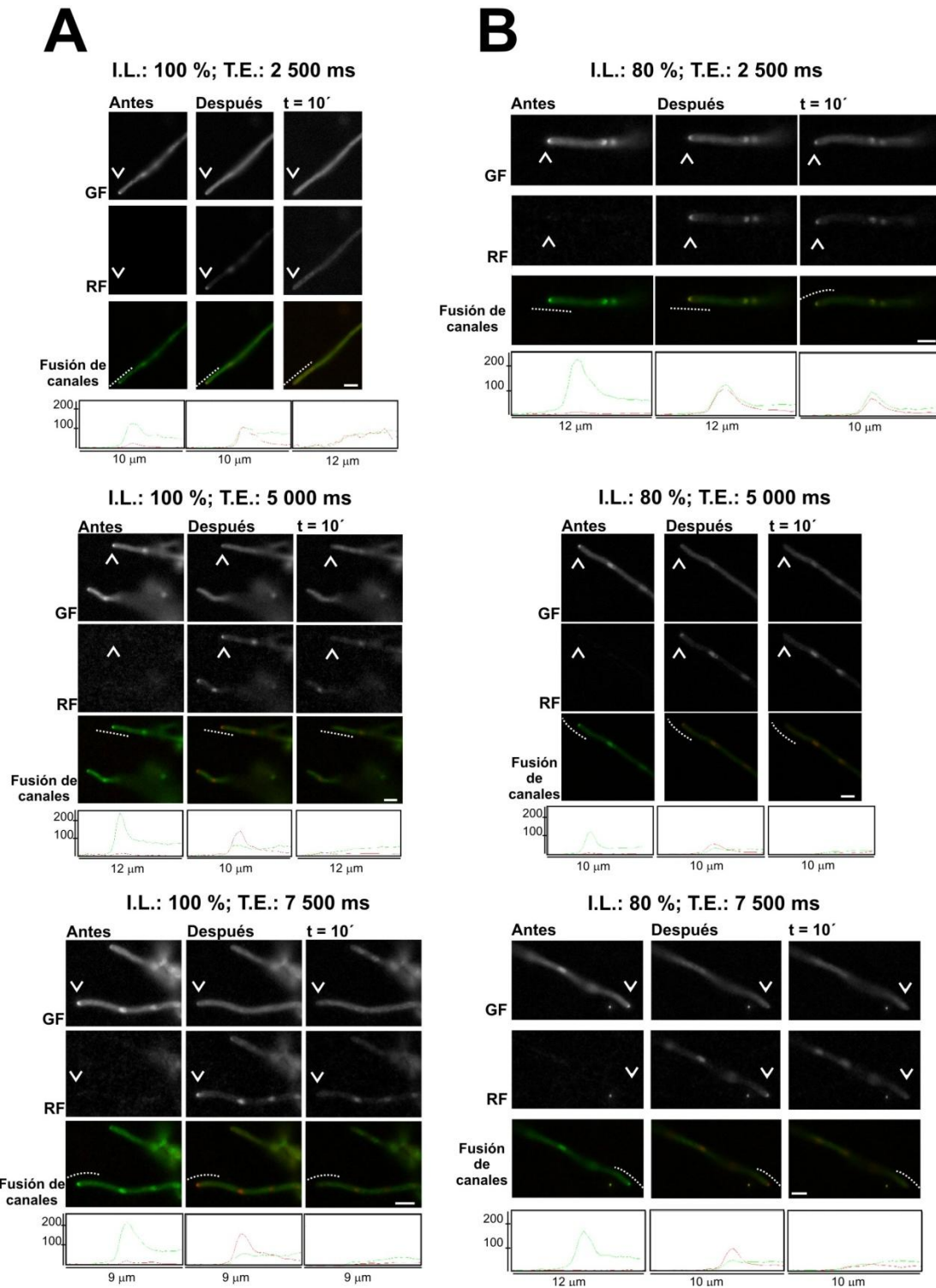


Figura 3.5: Análisis del efecto de la intensidad de la radiación UV y el tiempo de exposición en la fotoconversión de Dendra2. Se realizaron las medidas tomando como referencia la punta de las hifas vegetativas. Se muestra la fluorescencia verde (GF) y roja (RF) de $gpdA^{mini}::F1bB::Dendra2$ antes y después (0 y 10 minutos) de inducir la fotoconversión para cada intensidad de lámpara (I.L.; columnas, A: 100 % y B: 80 %) y tiempo de exposición (T.E.; filas, 1: 2 500 ms, 2: 5 000 ms, 3: 7 500 ms). Las puntas de flecha blancas indican las puntas de las hifas analizadas en los gráficos, los cuales muestran la intensidad de las fluorescencias verde y roja a lo largo de las líneas discontinuas. Barra de escala en todos los paneles: 5 μ m. Ver las relaciones de la disminución de GF y aumento de RF en la tabla 3.1. Las imágenes correspondientes a las intensidades de lámpara del 60 % y 40 % se muestran en el anexo 1.

3.2 Seguimiento de FlbB::Dendra2 tras la fotoconversión

Para validar el uso de Dendra2, se intentaron reproducir características previamente conocidas de la localización y la dinámica subcelular de FlbB. Así, se irradiaron las hifas vegetativas durante 8 s con luz UV al 80 % de intensidad, y se siguieron la recuperación de su crecimiento y la localización de FlbB::Dendra2 durante el máximo tiempo posible (4 horas en la hifa de la figura 3.6). La figura 3.7, por su parte, muestra la evolución de los valores de las fluorescencias verde y roja a lo largo de la hifa con el tiempo. Se detectó la fluorescencia verde en la punta y los núcleos antes de la fotoconversión, mientras que no se detectó señal alguna en el canal rojo (“antes” en las figuras 3.6 y 3.7). Tras la fotoconversión, se detectó la señal de la fluorescencia roja dispersa en la punta y también en los núcleos, mientras que la fluorescencia verde fue muy débil (t = 00:00, horas:minutos, en las figuras 3.6 y 3.7). La señal de FlbB en la punta (roja o verde) desapareció, probablemente como consecuencia de la inhibición del crecimiento polar. Con el tiempo, la fluorescencia verde en los núcleos aumentó gradualmente mientras que la roja disminuyó (t = 00:05 hasta 02:20). La ausencia de FlbB de la punta se mantuvo hasta que la hifa recuperó el crecimiento polarizado (t = 02:45), tras lo cual, la fluorescencia roja desapareció gradualmente (t = 02:45 hasta 04:00).

La secuencia de imágenes también permitió seguir un proceso de mitosis, durante el cual, como ya ha sido descrito previamente (Etxebeste *et al.*, 2009a), FlbB no se acumuló en los núcleos pero sí en la punta (t = 03:33), probablemente debido al mantenimiento del crecimiento polarizado. Se ha descrito previamente que la velocidad de crecimiento de las hifas no cambia significativamente en la mitosis con respecto a la interfase (Horio y Oakley, 2005) y que el crecimiento de la hifa y el ciclo celular son procesos independientes en hongos filamentosos (Riquelme *et al.*, 2003). Al acabar la división celular, se volvió a detectar la forma verde de FlbB::Dendra2 en los núcleos pero no la roja (t = 04:00) (Etxebeste *et al.*, 2009a). Los

resultados muestran que Dendra2 es una herramienta válida para el análisis de la localización y dinámica de FlbB (ver siguiente sección).

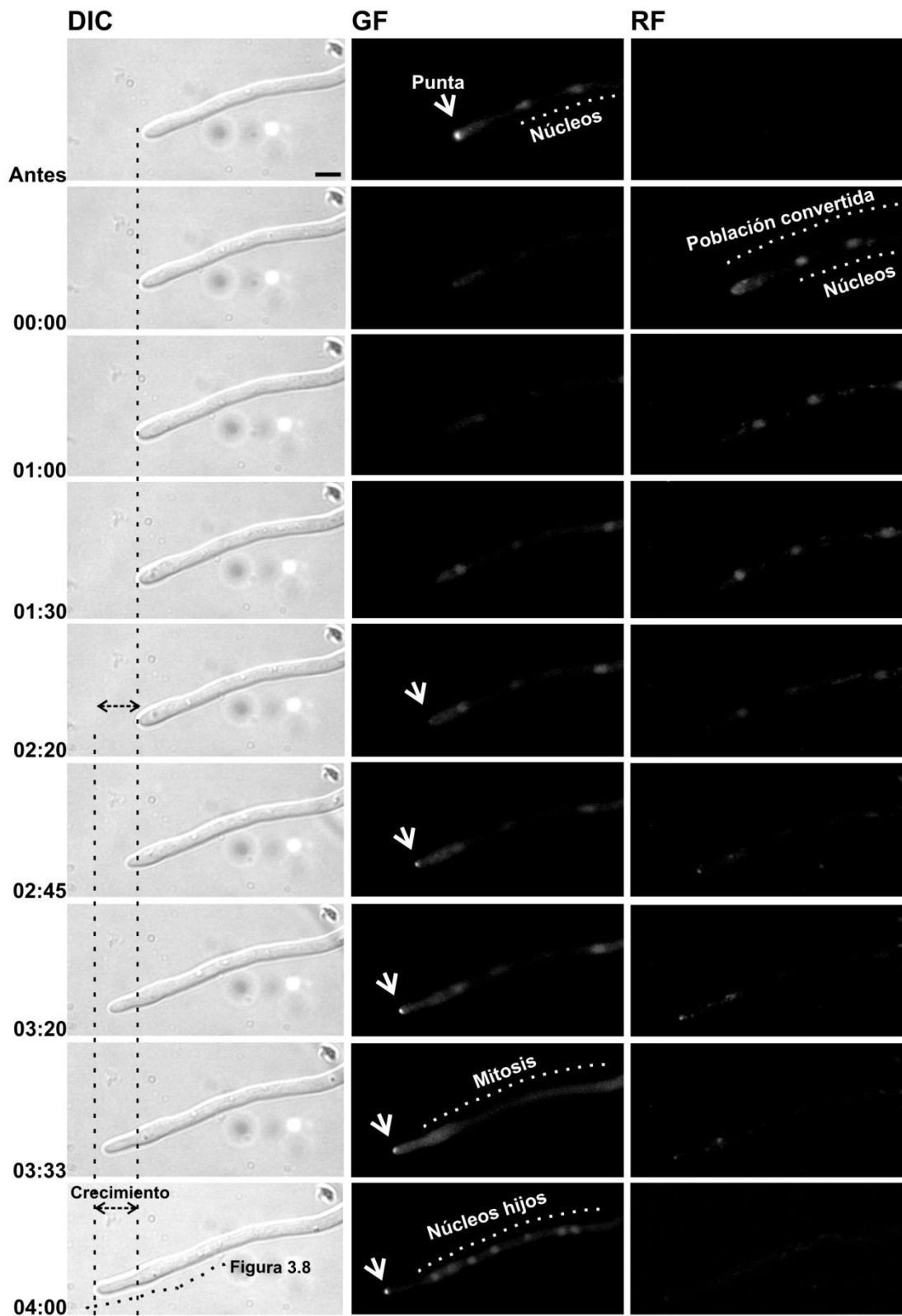


Figura 3.6: Análisis de la dinámica de FlbB::Dendra2. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia verde (GF), roja (RF) y en contraste de fases (DIC) de una hifa de *A. nidulans* que expresaba FlbB::Dendra2 bajo control de *gpdA^{mini}*. Se irradió todo el campo de visión con luz UV al 80 % de intensidad durante 8 s, provocando la fotoconversión de Dendra2 y la inhibición del crecimiento de la hifa. Se muestra una selección de los fotogramas del Vídeo Suplementario 1 incluido en (Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014). El tiempo se indica en horas:minutos. La línea discontinua en la última imagen de contraste de fases (DIC) indica la región de la hifa analizada en la figura 3.7. Barra de escala: 5 μ m.

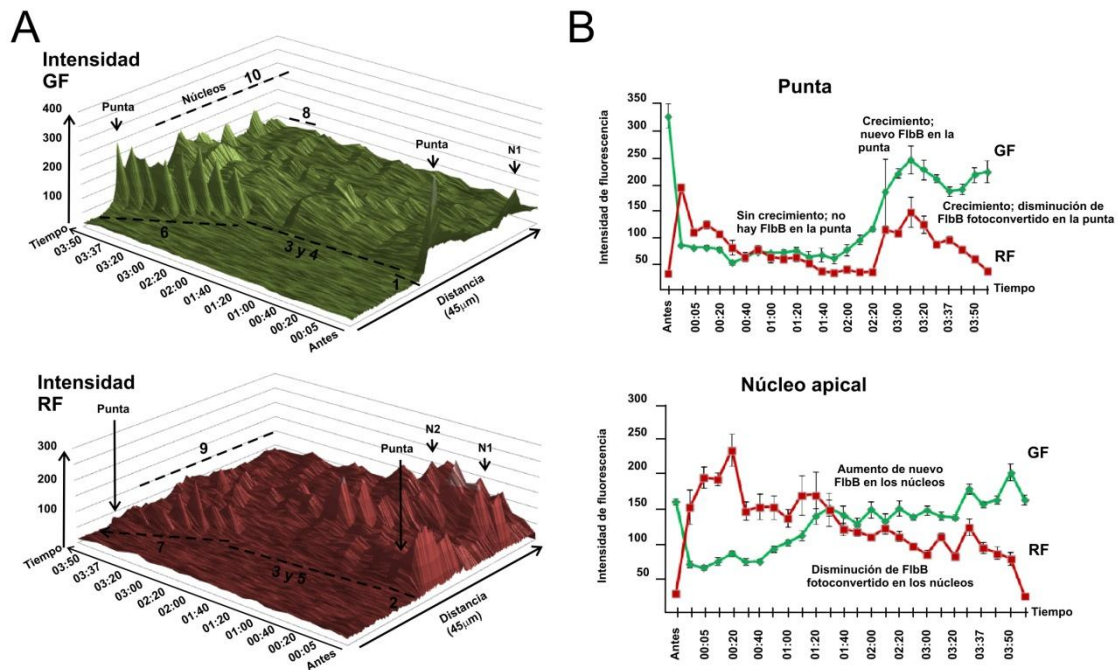


Figura 3.7: Evolución de la fluorescencia de FlbB::Dendra2 con el tiempo y a lo largo de la hifa vegetativa analizada en la figura 3.6. **A)** Gráficos tridimensionales que muestran la evolución en la intensidad de la fluorescencia (unidades arbitrarias) verde (arriba) y roja (abajo) a lo largo de la región indicada en la figura 3.6. N = núcleo. Los números indican: 1) Población inicial de FlbB antes de la fotoconversión (punta y núcleos). 2) Población de FlbB fotoconvertido en los núcleos y disminución de la intensidad en la punta. 3) Ausencia de FlbB en la punta. 4) Recuperación progresiva de la fluorescencia nuclear de FlbB (forma sintetizada tras la fotoconversión). 5) Disminución progresiva de la fluorescencia nuclear roja (forma fotoconvertida de FlbB::Dendra2). 6) Acumulación apical de FlbB de nueva síntesis. 7) Pérdida progresiva de la fluorescencia roja apical. 8) Mitosis: pérdida de la localización nuclear de FlbB. 9) Pérdida de la localización nuclear de la forma fotoconvertida tras la mitosis. 10) Recuperación de la localización nuclear de FlbB de nueva síntesis tras la mitosis. **B)** Evolución de las fluorescencias verde (GF) o roja (RF) (más *s.e.m.*; unidades arbitrarias) en la punta (arriba) o en el núcleo apical (abajo) de la hifa analizada en el panel A. El tiempo representa horas:minutos en ambos paneles.

3.3 FlbB migra desde la punta de la hifa hasta el núcleo

La fotoconversión de Dendra2 inducida con luz UV puede ser limitada a regiones específicas de la célula, utilizando para ello un diafragma que reduzca el campo de visión del microscopio a un tamaño adecuado (Baker *et al.*, 2010). Esta posibilidad ofrecía la herramienta

adecuada para analizar la posible migración de FlbB desde el ápice de las hifas vegetativas al núcleo.

Así, en primer lugar, se evaluó la posibilidad de fotoconvertir las poblaciones apical o nuclear de FlbB. Para ello, se adquirieron imágenes de todo el campo de visión antes de la fotoconversión (canales verde y rojo). Tras ello, se centró la región de interés o *ROI* (punta o núcleo apical) y se empleó un diafragma (Carl Zeiss) para reducir el campo de visión a un tamaño de 4-5 μm (círculos discontinuos en figuras 3.8A y B). Posteriormente, se irradió la *ROI* (80 % de intensidad; color azul en figura 3.8) durante 2 500 ms para inducir la fotoconversión de Dendra2 sin inhibir el crecimiento de la hifa y, por lo tanto, la acumulación apical de FlbB. Finalmente, se volvió a abrir el diafragma para comparar la intensidad de la fluorescencia roja y verde a lo largo de la hifa. Los resultados obtenidos muestran que poblaciones de FlbB::Dendra2 pueden ser fotoconvertidas, permitiendo el análisis propuesto al inicio de esta sección.

En segundo lugar, se siguió la evolución de la fluorescencia roja en los núcleos tras fotoactivar la población apical de FlbB. Justo después de la fotoactivación ($t = 0$ minutos, figura 3.8C), se detectó fluorescencia roja en la punta pero no en los núcleos. Sin embargo, 10 y 15 minutos después de la fotoconversión, se observó fluorescencia roja en los núcleos, demostrando así que FlbB migra de forma basipetal desde el ápice (Herrero-García *et al.*, 2015).

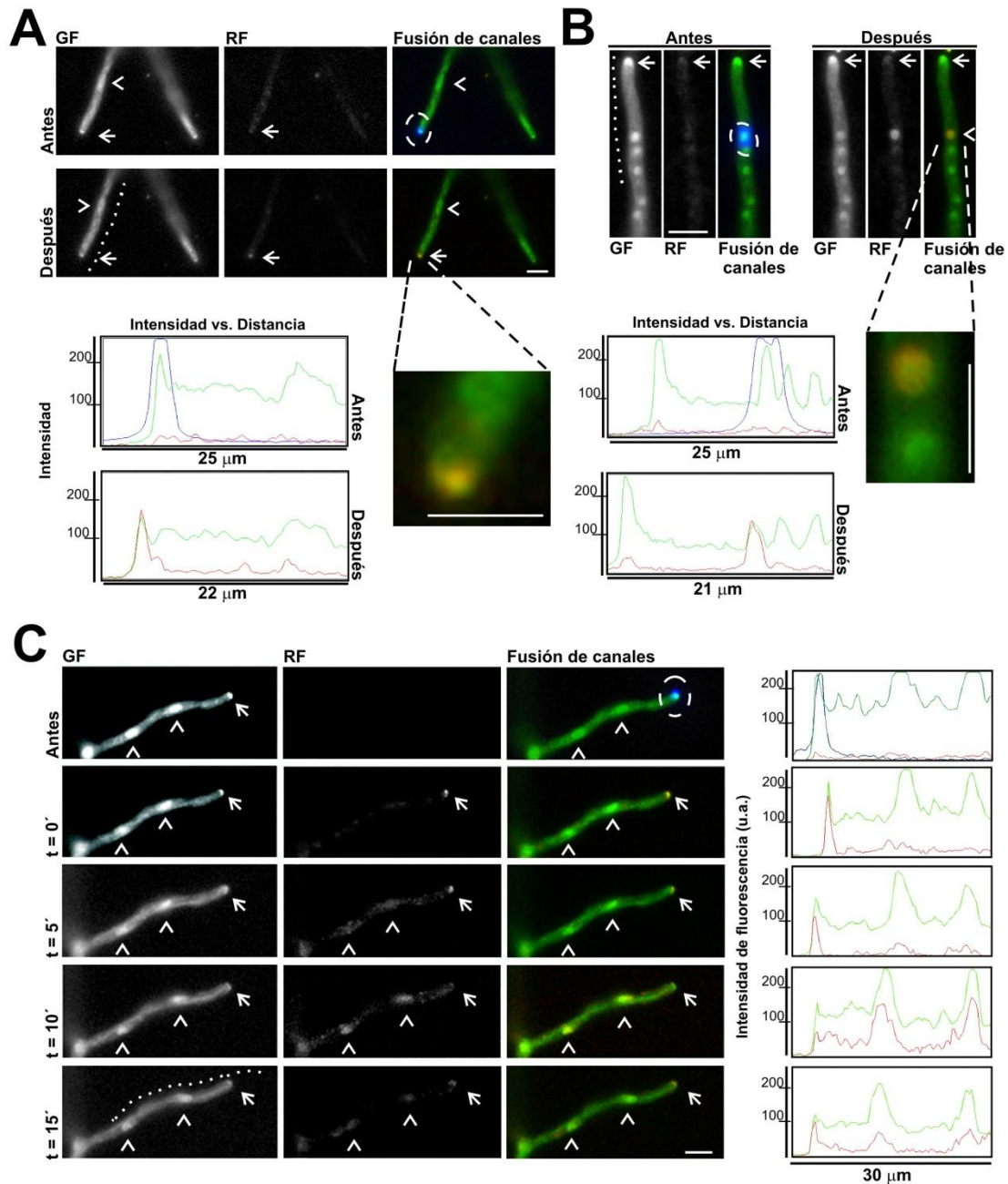


Figura 3.8: Fotoconversión de poblaciones específicas de FlbB::Dendra2. Se fotoconvirtieron selectivamente la población apical (**A**) o nuclear (**B**) de FlbB. Ambos paneles muestran tanto las imágenes de la fluorescencia verde (GF) y roja (RF) como la fusión de ambos canales antes y después de la fotoconversión. Se muestran también ampliaciones de la punta y el núcleo apical fotoconvertidos. Los gráficos inferiores muestran la intensidad de la fluorescencia verde y roja a lo largo de las líneas discontinuas. En ambos paneles, la fotoconversión se indujo exponiendo las ROIs a luz UV al 80 % de la intensidad máxima durante 2 500 ms. Los círculos y el color azul representan las regiones irradiadas con luz UV. **C) Migración de FlbB::Dendra2 desde la punta al núcleo.** Se obtuvieron imágenes de fluorescencia verde (GF), roja (RF) y la fusión de ambos canales antes y 0, 5, 10 y 15 minutos después de la fotoconversión de la población apical de FlbB (el color azul dentro del círculo discontinuo). Las gráficas a la derecha muestran la intensidad de la fluorescencia (unidades arbitrarias; u.a.) a lo largo de la hifa. Después de la fotoconversión, se estudió la redistribución de la fluorescencia roja de FlbB::Dendra2 entre la punta y el núcleo. La fotoconversión se indujo como se describe en los paneles A y B. Las flechas y las puntas de flecha blancas indican las puntas y los núcleos, respectivamente, en los tres paneles. Barra de escala en todos los paneles: 5 μm .

4. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el transporte acropetal de FlbB puede dividirse en dos etapas principales, una primera hasta el subápice y una segunda desde el subápice al ápice. Los filamentos de actina juegan un papel central en la segunda etapa. La alteración de la localización apical de FlbB al deletar *myoE^{myoV}* sugiere un papel de dicho motor molecular en este transporte actino-dependiente aunque dicha deslocalización también podría deberse a un efecto pleiotrópico. La cepa nula en *myoE* presenta severas deficiencias en el crecimiento vegetativo y sus colonias se extienden radialmente de forma muy lenta (Taheri-Talesh *et al.*, 2012). Así, la ausencia de un tercer elemento (o elementos) del ápice en este fondo genético podría ser la causa indirecta de la deslocalización de FlbB.

Otro punto a tener en cuenta es la diferencia observada al comparar la localización subcelular de FlbB en un fondo genético nulo de *myoE* o tras la adición de latrunculina B. En el primer caso, y al igual que ha sido propuesto para otras proteínas (Pantazopoulou *et al.*, 2014), FlbB podría seguir siendo capaz de unirse a los cables de actina mediante otros factores. Varios autores sugieren que proteínas con dominio “*myosin motor-like*” (MMD), el cual suele estar situado en el extremo amino terminal de la proteína (Hodges *et al.*, 2009; Schuster *et al.*, 2012), podrían unirse al cargo (Hodges *et al.*, 2009; Pantazopoulou *et al.*, 2014; Schuster *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2016). Ejemplos de este tipo de proteínas serían la quitina sintasa Mcs1 de *U. maydis* (Schuster *et al.*, 2012) o la quinesina Smy1 de *S. cerevisiae* (Hodges *et al.*, 2009), entre otros. Aunque Mcs1 es una quitina sintasa sin actividad motora asociada (Schuster *et al.*, 2012) y Smy1 es una quinesina, se ha propuesto que ambas son capaces de unirse a (Mcs1) o interaccionar electrostáticamente con (Smy1) los cables de actina (Hodges *et al.*, 2009). Los ortólogos de dichas proteínas en *A. nidulans* son CsmA (Takeshita *et al.*, 2005) y KinA (Requena *et al.*, 2001), respectivamente. Se ha propuesto que CsmA tampoco posee actividad motora (Takeshita *et al.*, 2015) y aunque su mutante nulo presenta defectos en la morfología de los conidióforos, la formación de estos es inducida (Horiuchi *et al.*, 1999). Takeshita y

colaboradores han propuesto que KinA es la encargada de transportar a CsmA al ápice (Takeshita *et al.*, 2015). Así, en ausencia de MyoE, proteínas como KinA podrían comenzar con el transporte de FlbB desde el subápice hacia el ápice pero, no completarlo, causando la acumulación descrita en la figura 3.2B. Al añadir latrunculina al medio, sin embargo, los cables de actina se despolimerizan, impidiendo cualquier tipo de transporte hacia el ápice y causando la retención de cargos en la región subapical.

Uno de los interactores ya conocidos de FlbB, FlbE, juega un papel esencial en la acumulación apical del FT. Los resultados de la figura 3.1 muestran una clara disminución en la acumulación apical de FlbB en el fondo nulo de *flbE*, sin que se genere acumulación alguna en la región subapical. Esta también es una diferencia reseñable en comparación con lo observado al desestabilizar los filamentos de actina y sugiere que ambas proteínas, FlbB y FlbE, migran conjuntamente hasta el ápice. Así, una posibilidad a analizar es que FlbE medie la incorporación de FlbB a su ruta de transporte. El estudio de los dominios funcionales de FlbB y FlbE, el cual será presentado en los capítulos 4 y 5, ayudará a entender mejor la relación funcional entre ambas proteínas y cómo interactúan.

La fotoconversión de la población apical de FlbB::Dendra2 y posterior acumulación de fluorescencia roja en los núcleos demuestran que, tras su acumulación apical, FlbB migra hacia estos. FlbB es el primer FT conocido en hongos filamentosos que muestra una localización apical y una migración basipetal desde ahí. Su dominio NLS juega un papel importante en esta migración punta-núcleo, ya que las mutaciones K67A;R68A afectan a su acumulación nuclear e inhiben la formación de conidios (Herrero-García *et al.*, 2015; Oiartzabal-Arango, 2016). Los experimentos realizados por la Dra. Elixabet Oiartzabal sugieren que el transporte basipetal y la acumulación nuclear de FlbB son microtúbulo- y FlbD-dependientes. En ausencia de *flbD*, FlbB no se acumula en los núcleos, dispersándose en el citoplasma y describiendo un movimiento bidireccional (acropetal y basipetal) que depende del citoesqueleto de tubulina

(Oartzabal-Arano, 2016). Estas cuestiones se desarrollarán en el capítulo 6. Los siguientes dos capítulos se centrarán en el mecanismo de transporte acropetal de FlbB y, principalmente en el análisis de la relación funcional entre FlbB y FlbE.

CAPÍTULO 4: Dominios funcionales de FlbB y su papel en la conidiación y la interacción con FlbE

1. Introducción

Un análisis bioinformático llevado a cabo por el Dr. Marc S. Cortese diferenció tres regiones funcionales en FlbB (Cortese *et al.*, 2011). El dominio bZIP de FlbB está situado en la región N-terminal y, siguiendo la norma general para este tipo de FFTT (Schutze *et al.*, 2008), se compone de un dominio de dimerización (DIM) y un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA-binding domain*) (color azul y rojo en figura 4.1A, respectivamente). El dominio DIM de FlbB contiene varios residuos conservados en comparación con el dominio DIM de Pap1, un FT tipo bZIP de la familia AP-1 de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Castillo *et al.*, 2002; Cortese *et al.*, 2011). El dominio central y el extremo C-terminal de FlbB también están parcialmente conservados en comparación con esta familia de reguladores transcripcionales, la cual señala el estrés oxidativo migrando entre el citoplasma y el núcleo (Asano *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2015). FlbB contiene en estas regiones seis residuos de cisteína (C236, C272, C280, C303, C382 y C397) (triángulos rojos en figura 4.1A). El estudio de la posición de estas cisteínas en 40 ortólogos de FlbB mostró la conservación total de las cisteínas 272 y 382 (figura 4.1A).

A través de un proceso de mutagénesis dirigida, en este capítulo se ha realizado un análisis funcional de las tres regiones principales de FlbB: N-terminal, central y C-terminal. Para ello, el estudio se ha centrado en el efecto de mutaciones específicas dentro del dominio de dimerización o la sustitución de cada una de las cisteínas de FlbB sobre 1) el fenotipo, 2) la localización subcelular de FlbB y FlbE y 3) la interacción entre ambos UDAs.

2. Papel de las cisteínas de FlbB en la conidiación

2.1 Efecto de las mutaciones C272A y C382A en la activación de *brlA* y conidiación

El grado de conservación de las distintas cisteínas de FlbB y el fenotipo *fluffy* obtenido al sustituir la cisteína 382 por alanina (Cortese *et al.*, 2011), por un lado, y la importancia de la

conformación reducida u oxidada de las cisteínas de Pap1, por el otro lado, motivaron el análisis funcional del resto de cisteínas de FlbB, situadas en las posiciones 236, 272, 280 y 303. Para ello, se generaron cepas que expresaban bajo control del promotor $gpdA^{mini}$ quimeras GFP::FlbB en las que dichos residuos habían sido reemplazados por alaninas (ver el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizado en el apartado 5.6 del capítulo 2). El fenotipo de las cepas generadas y la localización de FlbB fueron analizados y comparados con la cepa isogénica silvestre y los mutantes en las cisteínas 382 y 397 (Herrero-García *et al.*, 2015).

La figura 4.1B muestra que solamente la sustitución de C272 por una alanina inhibe la conidiación, mostrando un fenotipo *fluffy* similar al del mutante C382A (Cortese *et al.*, 2011; Herrero-García *et al.*, 2015). El fenotipo de la cepa con la doble mutación C272A;C382A es indistinguible respecto al de los mutantes simples. El reemplazamiento de cualquiera del resto de cisteínas (C236, 280 y 303) por alaninas no afecta significativamente a la cantidad de conidios producidos por unidad de área, mientras que al comparar los mutantes aconidiales, los cambios fueron significativos (figura 4.1B y C). La producción de conidios disminuía de $1.5-1.9 \cdot 10^7$ conidios/cm² en las cepas con fenotipo silvestre a $2.5-3.2 \cdot 10^6$ conidios/cm² en las cepas de fenotipo aconidial ($p < 0.05$ al comparar cepas aconidiales y la cepa de referencia; figura 4.1C).

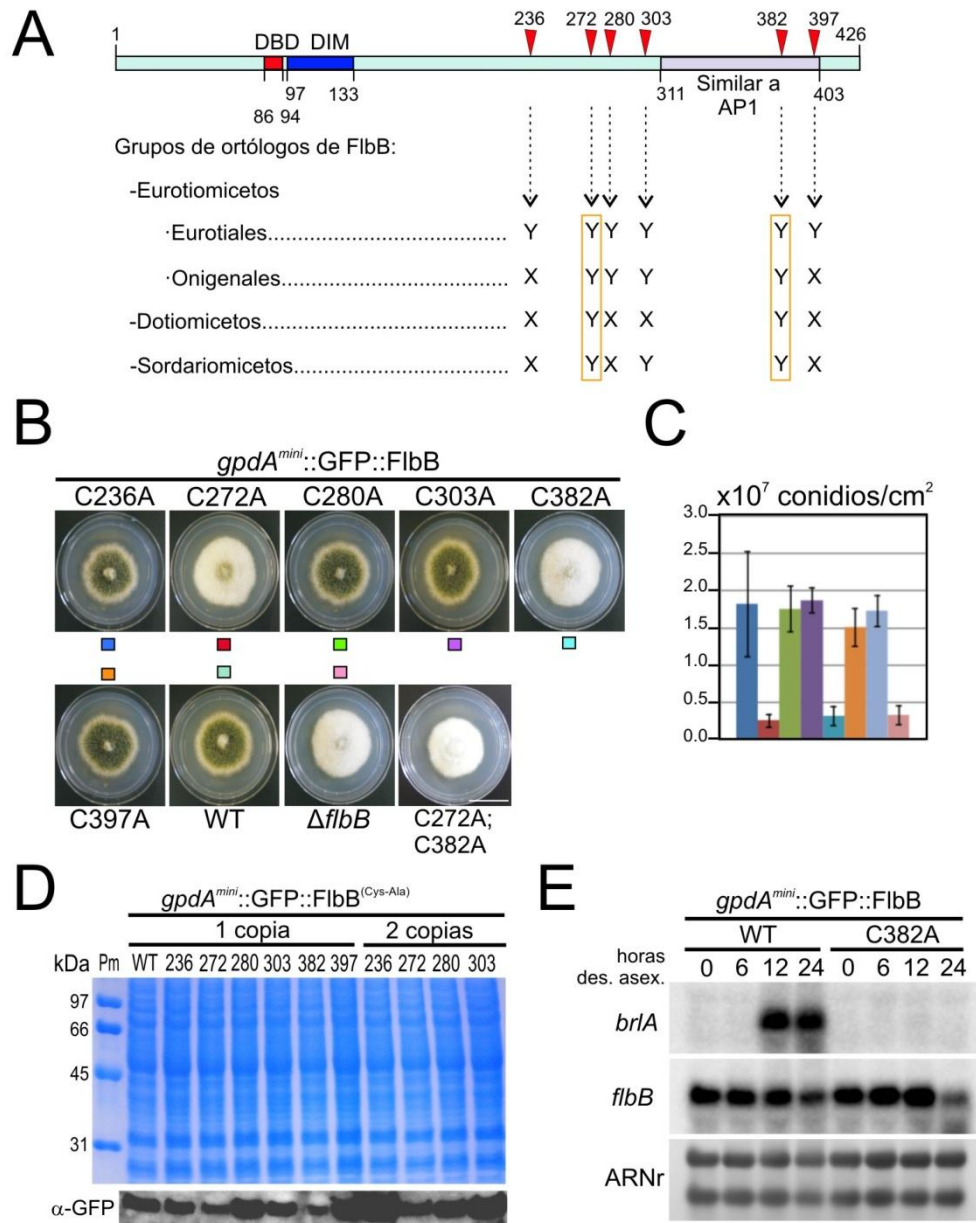


Figura 4.1: Efecto sobre la conidiación de la sustitución de las cisteínas de FlbB por alaninas. **A)** Diagrama que muestra la posición de las seis cisteínas de FlbB y su conservación en los ortólogos del FT en distintas clases de hongos filamentosos. “Y” representa la conservación de una cisteína específica mientras que “X” indica la no conservación (modificado a partir de (Cortese *et al.*, 2011)). **B)** Fenotipo de las cepas que expresan formas mutantes de la quimera GFP::FlbB (bajo promotor *gpdA^{mini}*) en cada una de sus cisteínas: C236A, C272A, C280A, C303A, C382A, C397A. Se utilizaron una cepa silvestre y un mutante nulo en *flbB* como controles. Se analizaron dichas cepas en MMA y tras 72 horas de cultivo a 37 °C. Barra de escala: 2 cm. **C)** Producción de conidios por unidad de área para cada una de las cepas analizadas en el panel B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas más *s.e.m.* Los valores obtenidos para la producción de conidios fueron los siguientes: $1.7 \cdot 10^7 \pm 2.1 \cdot 10^6$ para la cepa silvestre *gpdA^{mini}::GFP::FlbB*, $1.8 \cdot 10^7 \pm 7.1 \cdot 10^6$ para el mutante C236A, $2.5 \cdot 10^6 \pm 0.9 \cdot 10^6$ para el mutante C272A, $1.8 \cdot 10^7 \pm 3.1 \cdot 10^6$ para C280A, $1.9 \cdot 10^7 \pm 1.7 \cdot 10^6$ para C303A, $3.1 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$ para C382A, $1.5 \cdot 10^7 \pm 2.5 \cdot 10^6$ para C397A y $3.2 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$ conidios/cm² para el mutante nulo en *flbB* (*n* = 3; *p* < 0.05 al comparar las cepas de fenotipo *fluffy* con la referencia silvestre). **D)** Western-blot que muestra los niveles de las quimeras mutantes GFP::FlbB^(Cys-Ala), expresadas bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. Todas las quimeras analizadas presentan una banda principal a la altura de 75 kDa, aproximadamente. Se compararon extractos crudos de las cepas que integraban una o dos copias del plásmido *pgpdA^{mini}::GFP::FlbB^(Cys-Ala)*. El gel de poliacrilamida teñido con tinción Coomassie se utilizó como control de carga. **E)** Ensayo de Northern-blot que muestra los niveles de expresión de *flbB* y *brlA* en las cepas *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* y *gpdA^{mini}::GFP::FlbB^(C382A)* durante el crecimiento vegetativo y 6, 12 y 24 horas después de inducir la conidiación. Se empleó el ARN ribosomal (ARNr) como control de carga.

Durante el proceso de transformación de *A. nidulans* con los plásmidos que contenían las mutaciones en los codones que codifican las cisteínas de FlbB, se aislaron cepas en las que se habían integrado dos copias del plásmido. No se observaron cambios fenotípicos reseñables entre los mutantes con una o dos copias de un plásmido determinado (no mostrado). Todas las quimeras generadas fueron detectadas mediante *Western-blot*, con un aumento en los niveles de FlbB en las cepas con dos copias de plásmido (figura 4.1D). Estos resultados sugieren que el fenotipo aconidial generado por las mutaciones en las cisteínas 272 (figura 4.1B) y 382 (Herrero-García *et al.*, 2015) es independiente de la cantidad de proteína mutante.

Protoplastos de las cepas mutantes aconidiales C272A, C382A y el doble mutante C272A;C382A, así como el mutante de fenotipo silvestre C236A (este último a modo de control) fueron transformados con una construcción $flbE^{(p)}::gpdA^{mini}::FlbE::mRFP::pyrG^{Af}$, generada según el protocolo descrito en la sección 5.7 del capítulo 2. Se pudo analizar así el efecto de las mutaciones arriba indicadas en la localización de FlbE::mRFP, expresada también bajo control de $gpdA^{mini}$ (ver siguiente sección). Los fenotipos concuerdan con los observados previamente (figura 4.1B), de modo que aquellas cepas que contienen la sustitución de los codones correspondientes a las cisteínas 272 o 382, o el doble mutante, muestran un fenotipo *fluffy*, mientras que el mutante C236A produce un número de conidios similar al de la cepa de referencia (no mostrado). En resumen, estos resultados muestran que solamente la sustitución de las cisteínas 272 o 382 por alanina inhibe la conidiación.

Finalmente, se analizó si el fenotipo aconidial del mutante C382A de FlbB era causado por la reducción y/o retraso en la expresión de *brlA*. El experimento de *Northern-blot* de la figura 4.1E muestra una clara inhibición de su expresión en el mutante en comparación con la cepa silvestre, en la cual se detecta el transcrito a partir de las 12 horas de desarrollo asexual. Estos resultados confirman la incapacidad de inducir la expresión de *brlA* en el mutante C382, efecto que probablemente sea extensible al mutante C272A.

2.2 Los residuos C272 y C382 son necesarios para la localización apical de FlbB y FlbE

Se analizó la localización de FlbB y FlbE en los mutantes generados para determinar el efecto del reemplazamiento de cada cisteína. En primer lugar, se analizaron las cepas que únicamente expresaban las formas mutantes de GFP::FlbB, observándose una correlación entre los fenotipos descritos en la sección anterior y la localización de FlbB. El FT no se acumulaba en la punta de las hifas vegetativas en aquellas cepas que mostraban un fenotipo aconidial ($gpdA^{mini}::GFP::FlbB^{(C272A)}$, $gpdA^{mini}::GFP::FlbB^{(C382A)}$ y el doble mutante C272A;C382A), mientras que la localización apical se mantenía en aquellas cepas con fenotipo silvestre (figura 4.2A). En las cepas con el doble etiquetado, GFP::FlbB; FlbE::mRFP, ambas bajo control de $gpdA^{mini}$, la localización de FlbE::mRFP siguió el mismo patrón, localizándose en la punta cuando GFP::FlbB lo hacía pero, dispersándose en el citoplasma en los mutantes aconidiales (figura 4.2B).

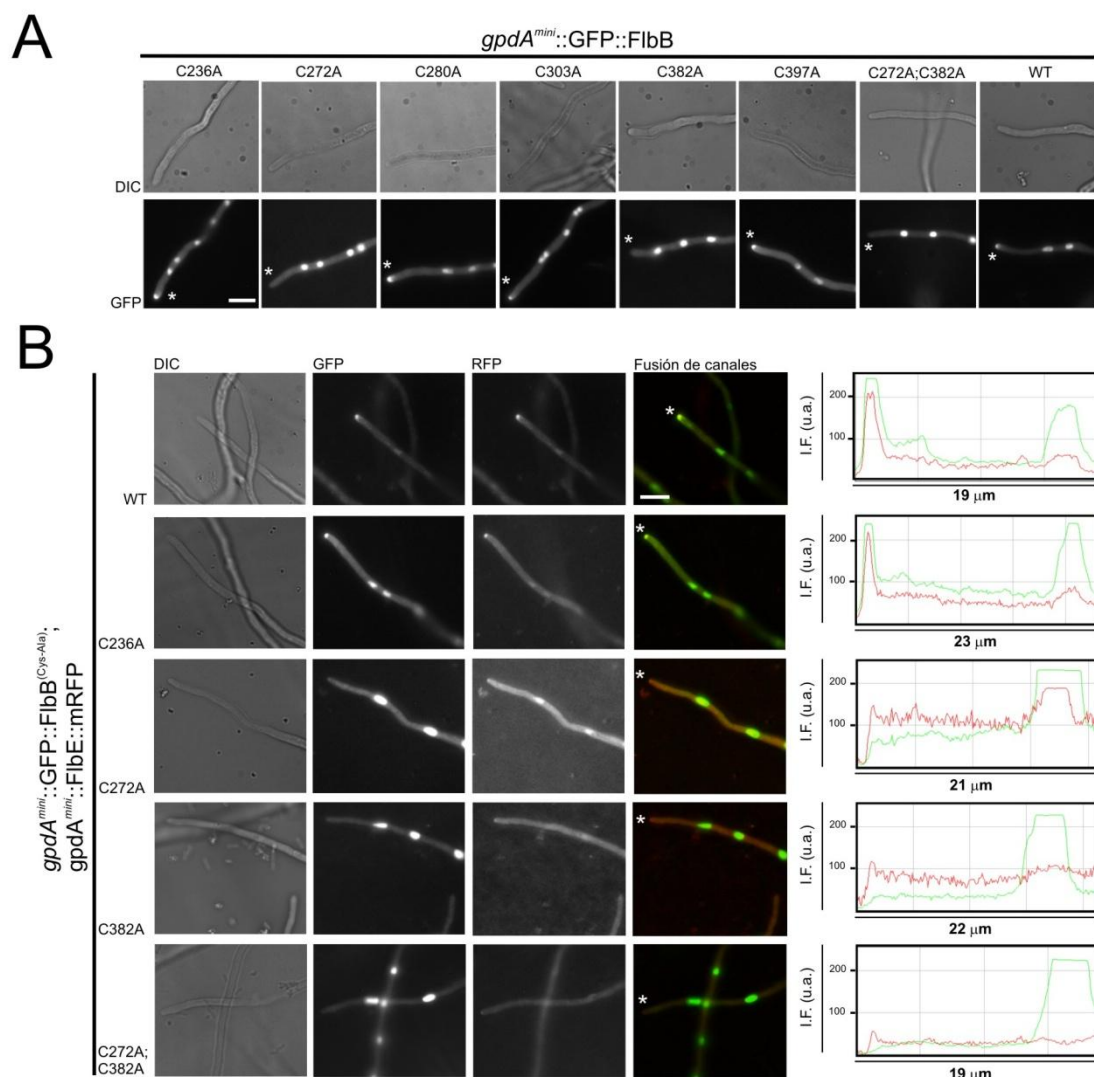


Figura 4.2: Localización subcelular de GFP::FlbB^(Cys-Ala) y FlbE::mRFP en hifas vegetativas de los mutantes en las cisteínas de FlbB. **A)** Localización subcelular de GFP::FlbB, expresado bajo control del promotor constitutivo *gpdA^{mini}*, en cada una de las cepas mutantes generadas: C236A, C272A, C280A, C303A, C382A, C397A, y C272A;C382A. Como control se empleó la cepa silvestre *gpdA^{mini}::GFP::FlbB*. Barra de escala: 5 μ m. Los asteriscos indican las puntas de las hifas vegetativas. **B)** Localización subcelular de GFP::FlbB y FlbE::mRFP, ambos bajo el promotor constitutivo *gpdA^{mini}*, en los mutantes en las cisteínas de FlbB que muestran fenotipo *fluffy* (C272A, C382A y el mutante en ambas cisteínas). La cepa silvestre y el mutante C236A, ambos con fenotipo conidiante, fueron empleados como controles. Los asteriscos indican las puntas de las hifas vegetativas. Las gráficas de la derecha muestran la intensidad de la fluorescencia (I.F.) roja y verde (unidades arbitrarias; u.a.) en la región de la hifa que comprende la punta y el núcleo apical. Barra de escala: 5 μ m.

2.3 Experimento de alquilación de cisteínas de FlbB

La conservación en los distintos ortólogos de las cisteínas situadas en las posiciones 272 y 382 de FlbB, así como el fenotipo y la localización subcelular de las quimeras mutantes C272A y C382A sugerían que dichos residuos podrían participar en la formación de un puente

disulfuro intramolecular, como ocurre en Pap1 de *S. pombe* (Castillo *et al.*, 2002). Los análisis realizados indicaban que las cisteínas 272 y 382 podrían ser equivalentes a aquellas situadas en las posiciones 278 y 501 en Pap1, respectivamente, las cuales forman un puente disulfuro como respuesta al estrés oxidativo e inducen la importación nuclear del FT (Castillo *et al.*, 2002; Cortese *et al.*, 2011; Vivancos *et al.*, 2004).

Para analizar si ese pudiera ser el caso de FlbB, se intentó reproducir los experimentos de alquilación de cisteínas descritos por los grupos de Hidalgo y Toledano, respectivamente (ver sección 7.1 del capítulo 2) (Delaunay *et al.*, 2000; Vivancos *et al.*, 2004). Para ello, en primer lugar, se debían determinar los tiempos de cultivo a los cuales debían recogerse los extractos de proteína. Así, se realizó un experimento de *Western-blot* con extractos de proteína correspondientes a una cepa que expresa la quimera FlbB::HA_{3x}. Se analizaron muestras recogidas a las 18 horas del crecimiento vegetativo y 1-6 horas del crecimiento asexual. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la cantidad de FlbB en las muestras correspondientes a la fase asexual en comparación con la fase vegetativa. Además, el desarrollo asexual se induce exponiendo el micelio al aire, situándolo en placas de petri con MMA (ver capítulo 2, sección 2.2), por lo que el entorno oxidante podría modificar la formación de un hipotético puente disulfuro entre las cisteínas 272 y 382 de FlbB.

Para el ensayo de alquilación, se utilizaron una cepa que expresaba la forma silvestre de FlbB::HA_{3x} y otra que expresaba la forma mutante en la C382. En ambos casos, se recogieron 4 tipos de muestras diferentes (ver pie de figura en 4.3), cada una a las 18 horas de crecimiento vegetativo y 2 horas después de inducir la conidiación (estas últimas son las que se muestran en la figura). A pesar de que se observaron cambios ligeros en la movilidad entre las diferentes muestras, las quimeras silvestre y C382A mostraron siempre la misma movilidad en cada una de las muestras, por lo que los resultados preliminares obtenidos no sustentan la hipótesis planteada. En cualquier caso, la ausencia de un control positivo fiable tampoco

permite descartarla (ver capítulo 6). Se realizó el mismo experimento con muestras recogidas a las 18 horas de crecimiento vegetativo, obteniendo el mismo resultado (no mostrado).

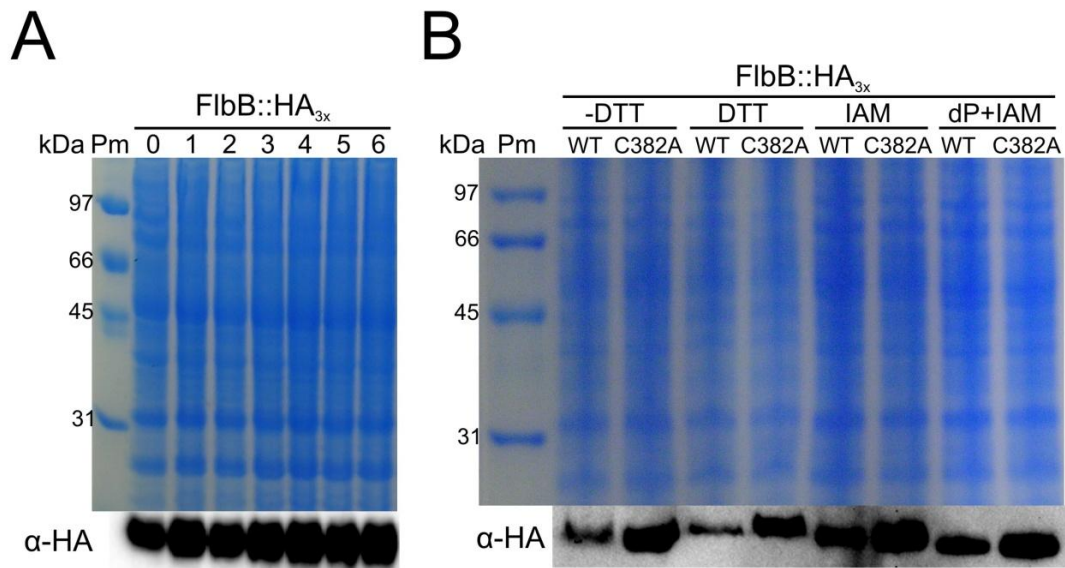


Figura 4.3: Movilidad electroforética de las quimeras FlbB::HA_{3x} silvestre y mutante C382A. A) Western-blot que muestra los niveles de la quimera FlbB::HA_{3x} silvestre a las 18 horas de crecimiento vegetativo y 1-6 horas de desarrollo asexual. La quimera analizada presenta una banda principal a la altura de 50 kDa, aproximadamente. El gel de poliacrilamida teñido con tinción *Coomassie* se utilizó como control de carga. **B)** Western-blot que muestra los niveles de las quimeras FlbB::HA_{3x} silvestre y mutante C382A. Las muestras se recogieron 2 horas después de haber inducido la conidiación. Se aislaron 4 tipos distintos de muestras para cada cepa y condición: 1) una muestra suspendida en un tampón de carga sin DTT, 2) una muestra suspendida en un tampón de carga con DTT, 3) una muestra con el alquilante yodoacetamida (IAM) suspendida en un tampón de carga sin DTT y 4) una muestra que previamente había sido desfosforilada (dP) y posteriormente alquilada con IAM, suspendida en un tampón de carga sin DTT. Las quimeras analizadas presentan una banda principal a la altura de 50 kDa aproximadamente. No se observan diferencias entre las dos quimeras (silvestre y mutante) en cada una de las condiciones. El gel de poliacrilamida teñido con tinción *Coomassie* se utilizó como control de carga.

3. El dominio DIM de FlbB juega un papel esencial en la interacción con FlbE

Los análisis bioinformáticos revelaron que el dominio de dimerización de FlbB diverge con respecto a otros dominios bZIP. En vez de tener 4-5 héptadas como en la mayoría de bZIPs (Vinson *et al.*, 2006) o 3-4 como en factores de tipo AP-1, el dominio DIM de FlbB contiene solo dos. Sin embargo, sí conserva varios residuos respecto al dominio de dimerización de Pap1 (Cortese *et al.*, 2011). Dos de los residuos conservados en la primera héptada de los dominios de dimerización de FlbB y Pap1 son L104 y E105 (numeración de FlbB). Así, se analizó la importancia de dichos residuos en la acumulación apical de FlbB. Para ello, se generó una cepa

que expresaba GFP::FlbB bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}* y en la que los residuos L104 y E105 de FlbB habían sido sustituidos por alaninas (DIM*: L104A;E105A). La forma mutante GFP::FlbB^(DIM*) fue detectada en los núcleos pero estaba excluida de la punta, lo cual derivaba en un fenotipo aconidial (figura 4.4A) (Herrero-García *et al.*, 2015).

En segundo lugar, se analizó si FlbB era capaz de homodimerizar y si dicha homodimerización dependía del dominio DIM. Para ello se realizaron ensayos de retención proteína-proteína (*Pull-Down*) utilizando una forma GST::FlbB^(DIM*) extraída a partir de cultivos de *E. coli*, por un lado, y extractos crudos de una cepa que expresa la quimera FlbB::HA_{3x} (figura 4.4B, izquierda). En el caso de la fusión GST::FlbB silvestre, los resultados mostraron una banda que podía corresponder al homodímero, la cual, desaparecía al mutar el dominio de dimerización.

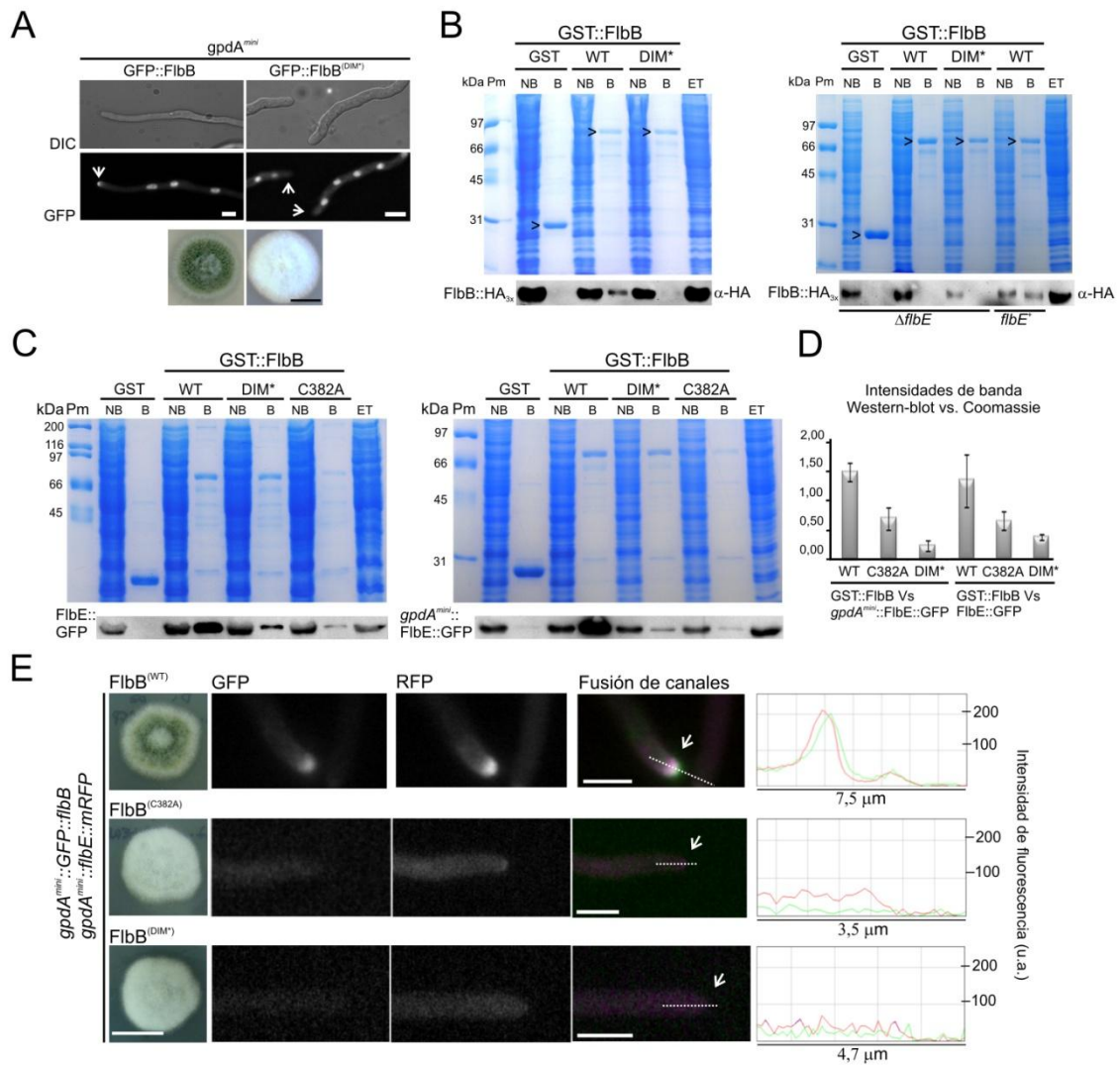


Figura 4.4: Efecto de las mutaciones L104A;E105A o C382A en la interacción entre FlbB y FlbE. **A)** Localización subcelular de las quimeras GFP::FlbB y GFP::FlbB^(DIM*), ambos bajo promotor constitutivo *gpdA^{mini}*, y fenotipo de las cepas que las expresan. Barra de escala en las imágenes de microscopía de fluorescencia: 5 μ m. Barra de escala en las placas: 2 cm. Se reprodujeron los resultados obtenidos por la Dra. Erika Herrero-García (Herrero-García, 2013). **B)** Ensayos de retención de proteína (*Pull-down*) utilizando las fusiones GST, GST::FlbB o GST::FlbB^(DIM*) como cebo (las puntas de flecha en el gel teñido con tinción *Coomassie*) y extractos de proteína de cepas que expresan FlbB::HA_{3x}, bajo promotor nativo, en un fondo genético silvestre (izquierda) o Δ *flbE* (derecha), respectivamente. NB: fracción sin unir a la resina (*non-bound fraction*); B: fracción unida a la resina (*bound fraction*); ET: Extracto total. **C)** Ensayo de retención de proteína (*Pull-down*) utilizando como cebo las quimeras GST, GST::FlbB, GST::FlbB^(DIM*) y GST::FlbB^(C382A), y extractos proteicos de las cepas que expresan la quimera FlbE::GFP bajo promotor nativo (izquierda) o constitutivo *gpdA^{mini}* (derecha). **D)** Gráfico que representa los ratios entre las intensidades de las bandas del *Western-blot* y *Coomassie* de los ensayos mostrados en el panel C. **E)** Izquierda: Fenotipo de las cepas *gpdA^{mini}::FlbE::mRFP* en los fondos genéticos *gpdA^{mini}::GFP::FlbB*, *gpdA^{mini}::GFP::FlbB^(C382A)* o *gpdA^{mini}::GFP::FlbB^(DIM*)*. Estas cepas se cultivaron durante 72 horas a 37 °C en MMA. Barra de escala: 2 cm. Derecha: Localización subcelular de las quimeras FlbE::mRFP y GFP::FlbB, GFP::FlbB^(C382A) o GFP::FlbB^(DIM*) en hifas vegetativas. Barra de escala en todos los paneles: 5 μ m. Las líneas discontinuas indican la región analizada en los gráficos, los cuales muestran la intensidad de la fluorescencia roja y verde (unidades arbitrarias, u.a.).

Sin embargo, no quedaba claro si la banda de retención correspondía a la formación de un homodímero GST::FlbB-FlbB::HA_{3x} o si, por el contrario, era consecuencia de la formación

de un heterodímero entre GST::FlbB y una forma de FlbE que previamente se había unido a la quimera FlbB::HA_{3x} del extracto de *A. nidulans*. Por ello, se realizó un nuevo ensayo utilizando un extracto crudo de una cepa FlbB::HA_{3x}; $\Delta flbE$, en la cual sigue habiendo expresión de *flbB* (Garzia *et al.*, 2009). En este caso, no se observó banda de retención de FlbB::HA_{3x}, sugiriendo que FlbB no es capaz de formar homodímeros y que forma un heterodímero con FlbE.

Por ello, se analizó el efecto que tienen las mutaciones DIM* y C382A sobre la interacción con FlbE en la punta de las hifas vegetativas. Debe tenerse en cuenta que la capacidad de la resina de glutatión sefarosa para retener a la quimera GST::FlbB^(C382A) era considerablemente menor que la que mostraba para retener al resto de formas GST::FlbB (silvestre y mutantes) (ver el anexo 2, paneles A y B). Esto podría ser debido a la formación de cuerpos de inclusión, los cuales podrían ser consecuencia de defectos de plegamiento en la quimera causados por la sustitución a alanina del residuo C382. Así, para tratar de mejorar la retención de la quimera GST::FlbB^(C382A) a la resina, se empleó DTT (5 mM) durante el experimento (Harper y Speicher, 2011; Rossi y Taylor, 2011) (ver apartado 7.3 del capítulo 2 y el anexo 2).

En los experimentos de retención entre GST::FlbB y FlbE::GFP se utilizaron extractos crudos provenientes de cepas que expresaban FlbE::GFP bajo control tanto del promotor nativo como del promotor constitutivo *gpdA^{mini}* (figura 4.4C). Los resultados mostraron que las mutaciones en el dominio de dimerización de FlbB inhibían considerablemente la interacción con FlbE::GFP. Este efecto era más acusado al utilizar el promotor *gpdA^{mini}*, ya que éste causaba un aumento de la concentración de FlbE::GFP y la estabilización del complejo FlbB/FlbE (figura 4.4C, derecha).

Asimismo, la sustitución del residuo C382 por alanina provocó una clara disminución de la intensidad de la banda de retención. No obstante, ello podía deberse a la baja cantidad de GST::FlbB^(C382A) unida a la resina. Por ello, se cuantificó la relación entre las intensidades de

las bandas obtenidas en el *Western-blot* y la tinción con *Coomassie*, observándose que la mutación C382A inhibía la interacción entre FlbB y FlbE pero, no al nivel de la mutación DIM* (figura 4.4D).

Finalmente, se analizó si la inhibición de la localización apical de FlbB causada por las mutaciones en el dominio de dimerización iba acompañada de la ausencia de FlbE de la punta. En este caso se utilizaron como control positivo una cepa que expresaba las formas silvestres de GFP::FlbB y FlbE::mRFP, y como control negativo una cepa que expresaba la forma mutante de FlbB C382A (figura 4.4E). En los tres casos, se utilizó *gpdA^{mini}* para expresar constitutivamente tanto GFP::FlbB como FlbE::mRFP. Los análisis de microscopía de fluorescencia confirmaron la hipótesis planteada.

Los resultados obtenidos en este capítulo confirman que tanto el dominio de dimerización como el extremo C-terminal son esenciales para la localización apical de FlbB y FlbE, pero el primero parece ser mucho más importante que el segundo para establecer la interacción entre ambos UDAs (Herrero-García *et al.*, 2015). Resultados adicionales muestran que el dominio bZIP de FlbB (residuos 67-140) es suficiente para establecer la interacción con FlbE mientras que la forma FlbB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾, la cual carece del dominio de unión a ADN y parte del de dimerización pero conserva todas las cisteínas, es incapaz de interaccionar (Herrero-García *et al.*, 2015).

4. Discusión

Si bien el dominio de dimerización de FlbB y las cisteínas 272 y 382 son esenciales para la localización apical de FlbB, parecen controlarla actuando a diferente nivel. Las cisteínas no parecen jugar un papel central en la dimerización con FlbE mientras que el dominio DIM parece ser el que la permite. En general, los FTTT de la familia bZIP homo- o heterodimerizan principalmente a través de sus dominios de dimerización, los cuales, a su vez, están situados

en el extremo C-terminal del dominio de unión a ADN (Amoutzias *et al.*, 2006; Amoutzias *et al.*, 2008). Los dominios de dimerización están compuestos por un número determinado de héptadas de aminoácidos, en las que cada residuo está numerado desde la letra “a” (primera posición) a la letra “g” (séptima posición). Las leucinas que definen este tipo de dominios ocupan casi siempre la posición central (“d”) de la héptada (O’Shea *et al.*, 1991). Por ello, al dominio de dimerización, o conjunto de héptadas, se le denomina también cremallera básica de leucina (*basic leucine ZIPper*; bZIP). Las posiciones “a” y “d” en cada héptada están ocupadas principalmente por residuos hidrofóbicos, formando una superficie hidrofóbica en la que cada aminoácido interacciona con su equivalente en el otro monómero, siguiendo una configuración conocida como *knobs-into-holes* (botones en los agujeros) (Vinson *et al.*, 2006). Este núcleo hidrofóbico proporciona la estabilidad necesaria a la cremallera de leucina (Vinson *et al.*, 2002; Vinson *et al.*, 2006). En el caso de FlbB de *A. nidulans*, los residuos situados en las posiciones “a” y “d” de la primera héptada son la isoleucina y la leucina de las posiciones 101 y 104, respectivamente, los cuales contienen una cadena lateral hidrofóbica y promoverían, por tanto, la formación y estabilización de dímeros (Cortese *et al.*, 2011). La mutación de la leucina en la posición 104 por una alanina probablemente altere la mencionada superficie hidrofóbica y, por tanto, la capacidad de formar dímeros.

Por el otro lado, las posiciones “e” y “g” frecuentemente contienen aminoácidos cargados (Cohen y Parry, 1990; Vinson *et al.*, 1993). En el caso de FlbB, el segundo residuo sustituido por alanina fue el ácido glutámico (E105) situado en la posición “e” de la primera héptada. La cadena lateral del ácido glutámico está cargada negativamente y probablemente modifique el carácter hidrofóbico de la interfase de dimerización, por lo que ha sido propuesto que puede influir en la selección de la proteína con la que se va a dimerizar (Cortese *et al.*, 2011). Su modificación a alanina, un residuo hidrofóbico, probablemente limite esta supuesta capacidad selectiva.

La generación y estudio de formas de GFP::FlbB truncadas en diferentes aminoácidos del extremo C-terminal (361, 341, 321 y 294) mostró que este dominio es esencial para la acumulación apical de FlbB pero no para la interacción con FlbE, ya que se continuaba detectando en experimentos de *Pull-down* la banda de interacción entre ambos UDAs en todos estos casos (Herrero-García *et al.*, 2015). Las cisteínas C272 y C382 son esenciales para la funcionalidad de los dominios central y C-terminal de FlbB y por ello su reemplazamiento por alaninas altera la localización del complejo FlbB/FlbE. Una de las posibilidades es que cualquiera de estas cisteínas formara un puente disulfuro con FlbE que ayudara a estabilizar aún más el complejo con FlbB. Sin embargo, FlbE carece de cisteínas, haciendo imposible esta opción (Cortese *et al.*, 2011). Así, los residuos C272 y C382 de FlbB podrían mediar la interacción con un tercer elemento desconocido aún o tener un papel relevante en la adquisición de la estructura tridimensional de FlbB requerida para el transporte acropetal.

Los residuos de cisteína pueden jugar un papel crítico en procesos como la regulación alostérica, la unión con metales y la estabilización estructural de proteínas (Pace y Weerapana, 2013). El elevado número de funciones posibles de las cisteínas deriva del gran número de modificaciones que pueden sufrir, las cuales a su vez, son consecuencia de las propiedades nucleofílicas y redox de su grupo tiol. Debido a su reactividad, los tipos de modificaciones postraduccionales (MPTs) que pueden sufrir las cisteínas pueden dividirse en espontáneas y catalizadas por enzimas (Couvertier *et al.*, 2014). Las espontáneas generalmente ocurren cuando dicha cisteína reacciona con oxidantes y electrófilos reactivos, tales como especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS/NOS, *reactive oxygen/nitrogen species*) y electrófilos derivados de lípidos (LDEs, *lipid-derived electrophiles*) (Couvertier *et al.*, 2014). Si la emergencia del micelio al aire induce la conidiación, se podría plantear la posibilidad de que un aumento de estas especies intensificara la señalización mediada por FlbB entre punta y núcleo. Mendoza-Martínez y colaboradores han descrito recientemente que la localización nuclear de NapA, ortólogo de Pap1 (*S. pombe*) y Yap1 (*S. cerevisiae*) en *A. nidulans*, se induce por la

adición de H₂O₂ al medio de cultivo (también en otras condiciones como la ausencia de una fuente de carbono en el medio (Mendoza-Martínez *et al.*, 2017)). Siguiendo esta línea, y a modo de experimento preliminar, se analizó la localización subcelular de FlbB tras la adición al medio de cultivo del agente oxidante H₂O₂ en una concentración de 1-5 µM, sin que se observaran cambios con respecto a las condiciones estándar (Dr. Eduardo A. Espeso, comunicación personal). Sin embargo, sería conveniente realizar experimentos adicionales empleando otros agentes oxidantes.

Son varias también las modificaciones catalizadas en las cisteínas por enzimas, tales como la prenilación (Zhang y Casey, 1996), la palmitoilación (Tom y Martin, 2013) y otras no tan habituales como la metilación y la fosforilación (Shannon y Weerapana, 2014). En todos estos casos se unen distintas moléculas a la cadena lateral de la cisteína modificada, tales como grupos hidrofóbicos (por ejemplo, prenilo o metilo), ácidos grasos o grupos fosfato. Esta adición regula o modula la interacción entre proteínas o en el caso de la prenilación también entre una proteína y un lípido como podrían ser los de la membrana plasmática. En el caso de FlbB, los estudios *in silico* llevados a cabo por la Dra. Erika Herrero-García sugerían que no había sitios de prenilación para FlbB (Herrero-García, 2013), aunque experimentalmente no se ha analizado esta posibilidad. Por el otro lado, la adición al medio de cultivo del 2-bromopalmitato (2-BP) (1-50 µM), compuesto que inhibe la palmitoilación (Fortwendel *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2000), no indujo cambio alguno en la localización de FlbB::GFP en hifas (Herrero-García, 2013).

En el caso de Pap1, las cisteínas 278 y 501 forman, bajo condiciones de estrés oxidativo, un puente disulfuro intramolecular que inhibe la unión entre su NES (*Nuclear export signal* o señal de exportación nuclear) y Crm1, el cual codifica una exportina que permite la exportación de cargos al citoplasma. Se permite, así, la migración del FT al núcleo (Castillo *et al.*, 2002). Una opción a considerar sería que FlbB también contuviera una NES que controlara

su localización. Los estudios bioinformáticos realizados por el Dr. Marc S. Cortese identificaron un dominio en la región C-terminal de FlbB, comprendido entre los aminoácidos 385 y 394, que mostraba una conservación parcial respecto a una NES clásica (c NES; *classical NES*; (La Cour *et al.*, 2003)). Sin embargo, se ha descrito que, a menudo, la señal NES clásica (L-x(2,3)-[LIVFM]-x(2,3)-L-x-[LI], donde x(2,3) indican 2 o 3 aminoácidos de distinta naturaleza) no sirve como modelo de secuencias de exportación nuclear, debido a que éstas son muy heterogéneas (La Cour *et al.*, 2003). En general, las secuencias NES constan de 4-5 residuos hidrofóbicos en una región de 10 aminoácidos y en el caso de FlbB hay 6 residuos hidrofóbicos entre los residuos 385 y 394 (**FGAVLEDFEL**). Sin embargo, la sustitución de los aminoácidos conservados F392 y E393 por alaninas no parece alterar la producción de conidios en las cepas que expresan las quimeras GFP::FlbB^(F392A;E393A) o FlbB::GFP^(F292A;E393A) (Herrero-García *et al.*, 2015). Las imágenes de fluorescencia de dichas quimeras no parecen mostrar una alteración significativa de la localización subcelular de FlbB. Además, la quimera GFP::FlbB⁽¹¹⁵⁻⁴²⁶⁾, la cual carece de la señal de localización nuclear de FlbB pero mantendría la supuesta NES, no está excluida de los núcleos (Herrero-García *et al.*, 2015). Por lo tanto, la existencia de un dominio NES en FlbB parece poco probable y debería haber otros mecanismos que permitan su acumulación apical.

La formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 272 y 382 es una posibilidad que se ha analizado de forma preliminar en este trabajo. El empleo del alquilante yodoacetamida (IAM) en cultivos que expresaban las quimeras FlbB::HA_{3x} silvestre y mutante C382A no ha permitido observar dos formas distintas de FlbB. Aunque el dominio DIM sea necesario para la interacción entre FlbB y FlbE y, por lo tanto, participe en el transporte acropetal, las cisteínas 272 y 382 no parecen jugar un papel central, pero pueden ser necesarias para el establecimiento de la estructura tridimensional de FlbB. No obstante, hasta ahora se desconoce la función de dichas cisteínas y el mecanismo que siguen para permitir la localización apical de FlbB y FlbE.

CAPÍTULO 5: Papel de los dominios funcionales de FlbE en la interacción con FlbB y la inducción de la conidiación

1. Introducción

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 sugieren que FlbB y FlbE migran conjuntamente a la punta de las hifas vegetativas. Además, varias de las mutaciones en FlbB analizadas en el capítulo anterior inhibían la localización apical de FlbE. En ausencia de FlbE, FlbB tampoco se sitúa en la punta (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-García *et al.*, 2015). Utilizando la secuencia proteica de FlbE como término de búsqueda, Garzia y colaboradores identificaron posibles ortólogos de este UDA en otras especies del género *Aspergillus*, tales como, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. clavatus* y en otros hongos del orden eurotiales como *Neosartorya fischeri*, o pleosporales como *Phaeosphaeria nodorum* (Garzia *et al.*, 2009). No se encontraron ortólogos en levaduras o en eucariotas superiores.

Los alineamientos de estas secuencias proteicas respecto a FlbE revelaron la presencia de dos regiones conservadas, denominadas A y B (figura 5.1), las cuales estaban separadas por una región no conservada a la que se designó como *linker* o secuencia de enlace (Garzia *et al.*, 2009). La región A abarcaba los residuos 1-93, la región B se localizaba entre los residuos 127 y 151, mientras que el *linker* comprendía los residuos 94-126 (figura 5.1). El aislamiento y caracterización preliminar de las formas mutantes FlbE::GFP S120P y A131V, las cuales no se acumulaban en la punta de las hifas vegetativas y causaban una inhibición de la conidiación, permitió proponer que las regiones de enlace y B, respectivamente, eran importantes para la funcionalidad de FlbE (Garzia *et al.*, 2009). Por otro lado, el extremo C-terminal de la proteína, situado entre los residuos D153 y S202, contenía un segmento enriquecido en residuos ácidos, principalmente ácido aspártico (D153-D175; figura 5.1). La conservación de este dominio entre los ortólogos de FlbE era baja (Cortese *et al.*, 2011; Garzia *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de los casos había una acumulación de residuos de ácido aspártico. La región entre los residuos G176 y S202 no mostraba conservación alguna entre los ortólogos de FlbE.

Tras este primer estudio, el Dr. Marc S. Cortese realizó análisis adicionales en los que, basándose en los datos de entropía, delimitó cinco regiones conservadas (figura 5.1): E1 (residuos 1-33), E2 (45-57), E3 (58-73), E4 (79-90), y finalmente, el dominio B descrito por Garzia y colaboradores, el cual fue rebautizado como E5 (127-151) (Cortese *et al.*, 2011).

La base de datos AspGD y el algoritmo SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Nielsen *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2011) sugerían que el dominio E1 podía actuar como péptido señal. El dominio E2, por su parte, contenía un residuo de lisina en la posición 51, el cual, de acuerdo con Chu y colaboradores, podría estar ubiquitinado (Chu *et al.*, 2016). La ubiquitinación no sólo está relacionada con la degradación de proteínas, sino que puede tener otras funciones como la señalización o el control de interacciones proteína-proteína (Schnell y Hicke, 2003). El dominio E3 y el extremo C-terminal de FlbE podrían contener hélices de poliprolina, las cuales suelen jugar un papel en la transducción de señales y el ensamblaje de complejos proteicos (Adzhubei *et al.*, 2013). Los análisis BLAST de una secuencia parcial de FlbE, la cual incluía el dominio E4, resaltaron la similitud con la estructura con código PDB (Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/home/home.do) 1UG9, correspondiente a una glucodextranasa de la bacteria *Arthrobacter globiformis* (Mizuno *et al.*, 2004). El alineamiento con la secuencia correspondiente a 1UG9 sugería que el dominio E4 podría contener residuos homólogos a aquellos que en 1UG9 se encuentran en la región de unión al sustrato (*substrate binding pocket site*).

Partiendo de estas predicciones bioinformáticas, en este capítulo se ha realizado un primer análisis funcional de los hipotéticos dominios propuestos en FlbE. Para ello, se han generado distintas formas mutantes y se han analizado el fenotipo resultante, la localización de FlbE y FlbB, y la interacción entre ambos UDAs.

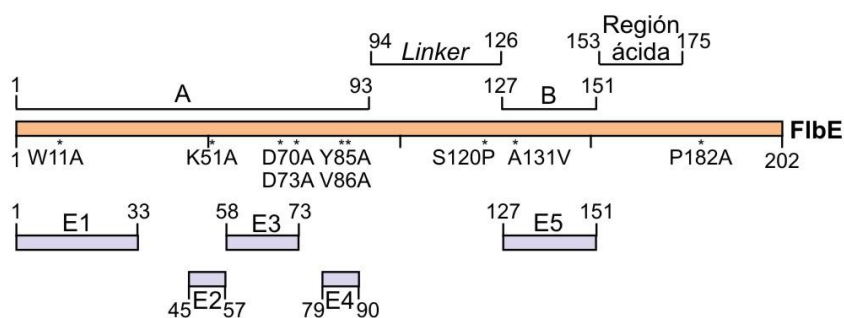


Figura 5.1: Esquema de los dominios conservados en FlbE y las mutaciones puntuales introducidas en estos. Predicción de los dominios funcionales de FlbE, basada en los análisis realizados por (Garzia *et al.*, 2009) (arriba) y (Cortese *et al.*, 2011) (abajo). Se muestran, asimismo, los residuos de FlbE seleccionados para ser sustituidos por alaninas.

2. La expresión constitutiva de *flbE* aumenta la acumulación apical de FlbB e induce la conidiación en medio de cultivo líquido

En comparación con los niveles de la quimera GFP::FlbB expresada bajo control del promotor nativo, la relación correspondiente a las intensidades de la fluorescencia entre la punta y el núcleo apical al utilizar el promotor *gpdA^{mini}* desciende de 1.48 ± 0.25 a 1.10 ± 0.10 , lo cual significa que la expresión constitutiva de FlbB aumenta la población nuclear en comparación con la apical (Herrero-García *et al.*, 2015; Perez-de-Nanclares-Arregi y Etxebeste, 2014). Sin embargo, aun cuando FlbB se expresa de forma constitutiva, la ausencia de FlbE inhibe la acumulación apical de FlbB (Herrero-García *et al.*, 2015). Así, si la concentración apical de FlbB depende de la cantidad de FlbE disponible para la interacción entre ambos UDAs, un aumento de los niveles de FlbE debería, a su vez, incrementar dicha concentración apical de FlbB. Por ello, se decidió generar cepas *gpdA^{mini}::GFP::FlbB* que también expresaran constitutivamente, bajo control del promotor *gpdA^{mini}*, FlbE::mRFP o FlbE::Stag (las construcciones para la transformación se generaron por PCR de fusión; ver protocolo en el apartado 5.7 del capítulo 2). En ambas cepas la fluorescencia apical de GFP::FlbB fue significativamente mayor que al expresar FlbE bajo control del promotor nativo (figura 5.2A). La relación de la intensidad de la fluorescencia verde entre la punta y el núcleo apical aumentó de 1.11 ± 0.24 en la cepa parental a 1.78 ± 0.45 en la cepa *gpdA^{mini}::FlbE::Stag* y 1.83 ± 0.53 en

Papel de los dominios funcionales de FlbE en la interacción con FlbB y la inducción de la conidiación

la cepa $gpdA^{mini}::FlbE::mRFP$, respectivamente ($n = 15$ hifas para cada cepa; $p = 6.3 \cdot 10^{-6}$ y $5.5 \cdot 10^{-5}$, respectivamente). Estos resultados sugieren que la concentración de FlbB en la punta de la hifa vegetativa está directamente relacionada con la concentración de FlbE.

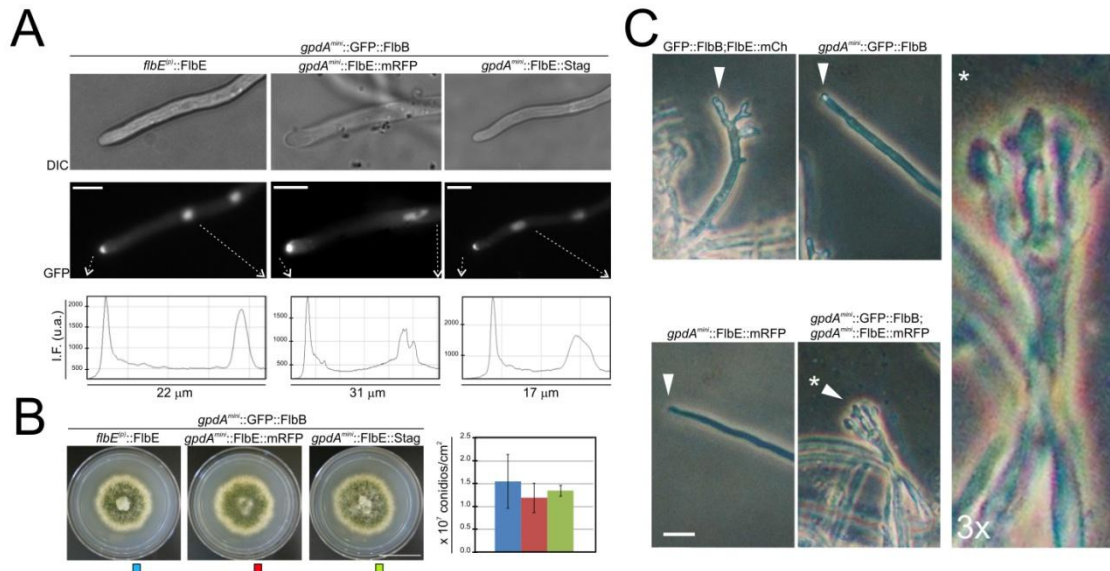


Figura 5.2: Efecto de la expresión constitutiva de las quimeras GFP::FlbB y FlbE::mRFP o FlbE::Stag. **A)** Localización subcelular de la quimera GFP::FlbB, expresada bajo control de $gpdA^{mini}$, en cepas que expresan FlbE bajo control del promotor nativo (izquierda), y FlbE::mRFP (centro) o FlbE::Stag (derecha) bajo control del promotor $gpdA^{mini}$. Los gráficos en la parte inferior del panel muestran la intensidad de la fluorescencia verde (I.F., unidades arbitrarias (u.a.)) en la región delimitada por las flechas discontinuas. Los valores promedio (ver texto principal) se calcularon utilizando 15 medidas para cada cepa más *s.e.m.* Barra de escala: 5 μ m. **B)** (Izquierda) Fenotipo de las cepas analizadas en el panel A, en MMA sólido y después de 72 horas de cultivo a 37 °C. Barra de escala: 2 cm. (Derecha) Producción de conidios por unidad de área para cada cepa ($1.55 \cdot 10^7 \pm 5.90 \cdot 10^6$ conidios/cm² en la cepa parental, $1.20 \cdot 10^7 \pm 3.22 \cdot 10^6$ conidios/cm² en $gpdA^{mini}::GFP::FlbB$; $gpdA^{mini}::FlbE::mRFP$ y $1.35 \cdot 10^7 \pm 1.21 \cdot 10^6$ conidios/cm² en $gpdA^{mini}::GFP::FlbB$; $gpdA^{mini}::FlbE::Stag$). Se calculó el promedio de tres réplicas para cada cepa más *s.e.m.* **C)** Fenotipo de las cepas 1) GFP::FlbB; FlbE::mCh, 2) $gpdA^{mini}::GFP::FlbB$, 3) $gpdA^{mini}::FlbE::mRFP$ y 4) $gpdA^{mini}::GFP::FlbB$; $gpdA^{mini}::FlbE::mRFP$, tras 26 horas de cultivo en MMA líquido adecuadamente suplementado. La cepa que expresa tanto GFP::FlbB como FlbE::mRFP bajo control de $gpdA^{mini}$ produjo conidióforos; mientras que el resto de las cepas mantuvieron un crecimiento vegetativo. En el panel de la derecha se muestra una ampliación (3x) del conidióforo señalado mediante el asterisco. Barra de escala: 10 μ m.

Se analizó también si la mayor acumulación apical de FlbB observada al expresar tanto FlbB como FlbE bajo control del promotor $gpdA^{mini}$ iba acompañada de una mayor producción de conidios o una inducción prematura de la conidiación. Para ello, se analizaron las cepas mostradas en la figura 5.2A en MMA sólido y líquido (figura 5.2B y C, respectivamente). En medio sólido no se observó ninguna diferencia significativa en la producción de conidios por unidad de área con respecto a la cepa parental ($n = 3$ para cada cepa; $p > 0.05$ en todos los

casos; ver valores en pie de figura 5.2B). Sin embargo, al analizar dichas estirpes en medio líquido sí se observaron claras diferencias fenotípicas. En este caso, se compararon las cepas analizadas previamente ($gpdA^{mini}::GFP::FlbB$; $gpdA^{mini}::FlbE::mRFP$ y $gpdA^{mini}::GFP::FlbB$; $gpdA^{mini}::FlbE::Stag$) con los siguientes controles: 1) una cepa que expresaba las quimeras $GFP::FlbB$ y $FlbE::mCh$ simultáneamente, ambas bajo control de sus respectivos promotores; 2) una cepa que expresaba la quimera $GFP::FlbB$ bajo control de $gpdA^{mini}$; y 3) una cepa que expresaba la quimera $FlbE::mRFP$, también bajo control de $gpdA^{mini}$. Tras 26 horas de cultivo a 37 °C y 200 rpm, las cepas control generaron únicamente hifas vegetativas. Sin embargo, la cepa con el doble etiquetado, $GFP::FlbB$ y $FlbE::mRFP$, ambos bajo control de $gpdA^{mini}$, produjo conidióforos compuestos por todos los tipos celulares característicos de estas estructuras (figura 5.2C). Se obtuvieron los mismos resultados en la cepa que expresaba constitutivamente $GFP::FlbB$ y $FlbE::Stag$ pero estos no se muestran en la figura 5.2. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la acumulación de FlbB en la punta depende de la disponibilidad y concentración de FlbE, y que una mayor acumulación del complejo en la región de crecimiento causa una inducción prematura de la conidiación en condiciones de cultivo específicas.

3. Mutagénesis dirigida de los dominios conservados de FlbE

En el capítulo anterior, se analizó la función de varios de los dominios conservados de FlbB. Una de las características estudiadas fue el papel de cada uno de estos dominios en la interacción con FlbE. En este caso, y considerando la relación existente entre los niveles de FlbE y la cantidad de FlbB que se acumula en la punta de la hifa, por un lado, y los dominios conservados diferenciados en FlbE, por el otro lado, se ha realizado un primer análisis de su función.

3.1 Mutagénesis dirigida en FlbE

Para analizar funcionalmente los dominios predichos en FlbE, se decidió reemplazar residuos específicos de cada uno de ellos por alaninas (figura 5.1). Debido a su elevada conservación y posición central en el supuesto péptido señal, se seleccionó el residuo de triptófano en la posición 11 del dominio E1. En el caso del dominio E2, se seleccionó la lisina en la posición 51 (Chu *et al.*, 2016). Los residuos de ácido aspártico en las posiciones 70 y 73 fueron los seleccionados en el dominio E3 debido a la importancia que pudieran tener en la conformación de una supuesta hélice de poliprolina. Debido a su elevada conservación entre los ortólogos de FlbE y la importancia que pudieran tener en la conformación de la supuesta región de unión a sustrato, se reemplazaron los residuos de tirosina y valina en las posiciones 85 y 86 dentro del dominio E4. Finalmente, se seleccionó la prolina en la posición 182, situada en la región C-terminal de la proteína. Las mutaciones S120P y A131V mencionadas previamente permitieron proponer que el dominio de enlace y el dominio E5 son necesarios para la localización apical de FlbE y la inducción de la conidiación (Garzia *et al.*, 2009).

3.2 Las mutaciones en los dominios E1, E3 y E4 de FlbE inhiben la conidiación

Utilizando como molde ADN genómico de una cepa $gpdA^{mini}::FlbE::GFP$ y siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.8 del capítulo 2, se generaron nuevas construcciones que incluían cada una de las sustituciones propuestas en la sección anterior (ver también figura 5.1). Estos productos de PCR de fusión fueron utilizados para transformar protoplastos de una cepa silvestre. La correcta integración se confirmó mediante la técnica de *Southern-blot* y la presencia de las mutaciones mediante secuenciación (no mostrado). En todos los casos se pudieron detectar las quimeras FlbE::GFP mutantes mediante la técnica de *Western-blot* y en las condiciones utilizadas no se observaron cambios en su movilidad electroforética respecto a

la de la forma silvestre (figura 5.3A, las bandas aparecen a una altura de 50 kDa aproximadamente).

En primer lugar, se analizó el efecto de cada mutación en la producción de conidiosporas. Las mutaciones K51A y P182A (dominios E2 y C-terminal) no causaron cambios significativos en comparación con la cepa silvestre isogénica ($p > 0.5$ en ambos casos; $n = 3$ para cada cepa; ver valores en pie de figura 5.3B). Sin embargo, las mutaciones W11A, D70A;D73A y Y85A;V86A, localizadas en los dominios E1, E3 y E4, respectivamente, causaron un fenotipo aconidial, con una producción de esporas asexuales significativamente inferior a la cepa parental (figura 5.3B). La cepa silvestre ($gpdA^{mini}::FlbE::GFP$) produjo $1.1 \cdot 10^7 \pm 1.2 \cdot 10^6$ conidios/cm² mientras que los mutantes W11A, D70A;D73A y Y85A;V86A produjeron entre $6.2 \cdot 10^6 \pm 0.9 \cdot 10^6$ y $4.1 \cdot 10^6 \pm 1.9 \cdot 10^6$ conidios por cm² ($p = 0.02, 0.006$ y 0.01 , respectivamente; $n = 3$ para cada cepa) (ver valores en pie de figura 5.3B).

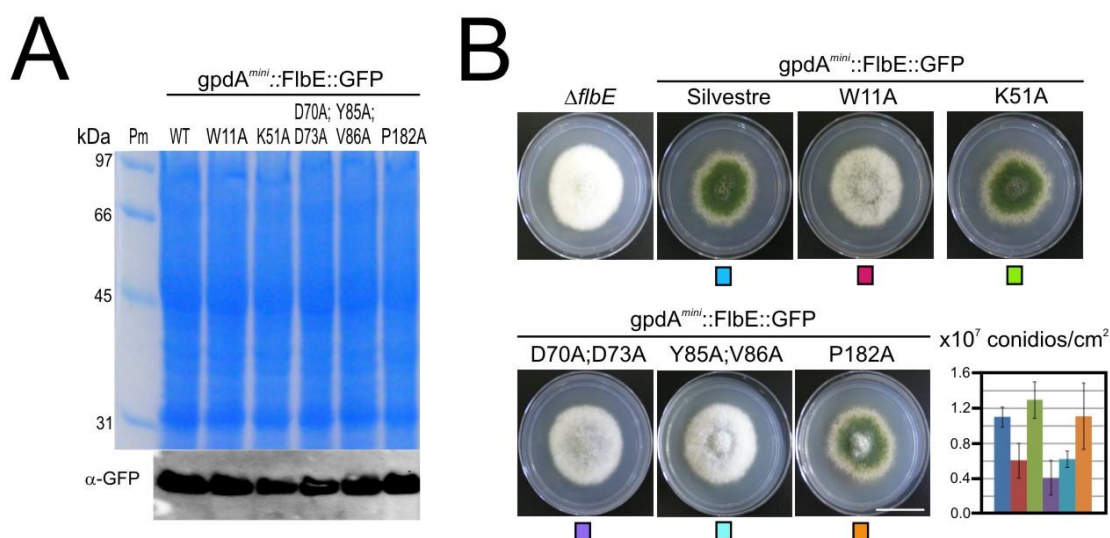


Figura 5.3: Efecto de las mutaciones introducidas en FlbE sobre la conidiación. **A)** Experimento de *Western-blot* para detectar las quimeras FlbE::GFP analizadas en extractos crudos de las estirpes correspondientes. El gel de poliacrilamida teñido con tinción *Coomassie* se muestra como control de carga. **B)** Fenotipo de los mutantes FlbE::GFP generados (W11A, K51A, D70A;D73A, Y85A;V86A y P182A), en MMA tras 72 horas de cultivo a 37 °C. La quimera FlbE::GFP se expresa en todos los casos bajo control del promotor constitutivo $gpdA^{mini}$. Se comparó el fenotipo de dichas cepas con el del mutante nulo de *flbE* y con una cepa isogénica silvestre. El gráfico muestra el número de conidios por unidad de área producidos por cada mutante (promedio de tres réplicas para cada cepa más *s.e.m.*). La cepa silvestre ($gpdA^{mini}::FlbE::GFP$) produjo $1.1 \cdot 10^7 \pm 1.2 \cdot 10^6$ conidios/cm² mientras que los mutantes W11A, K51A, D70A;D73A, Y85A;V86A y P182A produjeron $6.1 \cdot 10^6 \pm 2.0 \cdot 10^6$, $1.2 \cdot 10^7 \pm 2.8 \cdot 10^6$, $4.1 \cdot 10^6 \pm 1.9 \cdot 10^6$, $6.2 \cdot 10^6 \pm 0.9 \cdot 10^6$ y $1.1 \cdot 10^7 \pm 1.0 \cdot 10^6$ conidios por unidad de área, respectivamente ($p = 0.02, 0.5, 0.006, 0.01$ y 0.2 , respectivamente; cambio significativo en las cepas aconidiales; $n = 3$ para cada cepa).

En segundo lugar, se utilizaron muestras de ADN genómico de las cepas descritas en el párrafo anterior para generar construcciones FlbE::mRFP mutantes fusionadas al promotor *gpdA^{mini}*. Se siguió el mismo procedimiento descrito al inicio de esta sección (ver también la sección 5.7 del capítulo 2) pero, en este caso, dichas construcciones se utilizaron para transformar protoplastos de una cepa que expresaba la quimera GFP::FlbB bajo control de *gpdA^{mini}*. En este fondo genético, las mutaciones descritas causaron los mismos fenotipos que en el fondo genético silvestre; es decir, las mutaciones W11A, D70A;D73A y Y85A;V86A generaron un fenotipo *fluffy*, mientras que las demás sustituciones no produjeron cambios significativos en la producción de conidios (no mostrado).

3.3 Las mutaciones en los dominios E1 y E4 deslocalizan a FlbB y FlbE de la punta

Tras describir el efecto que las mutaciones generadas en FlbE tienen sobre la conidiación, se analizó su efecto sobre la localización subcelular de FlbE y FlbB. De acuerdo con el fenotipo conidiante descrito en la sección anterior, las formas mutantes de FlbE K51A y P182A se localizaban en la punta de las hifas, al igual que la forma silvestre (figura 5.4A). En el caso de las mutaciones que causaban un fenotipo aconidial, se observaron efectos diferentes sobre la localización de FlbE. Mientras que las mutaciones W11A y Y85A;V86A causaron la ausencia de FlbE de la punta de las hifas y una dispersión a lo largo del citoplasma, una fracción de FlbE^(D70A;D73A)::GFP todavía se acumulaba en la punta (figura 5.4A). En este último caso, los valores de la fluorescencia verde en la punta disminuían alrededor de un 27 % en comparación con la cepa silvestre (n = 12 medidas para cada cepa, p = 3.98·10⁻⁵, cambio significativo). Sin embargo, de su fenotipo aconidial se deduce que esta forma apical de FlbE no es funcional o no se acumula en la cantidad suficiente como para que se induzca la conidiación. De nuevo, la localización apical de GFP::FlbB se correlacionaba con la de

FlbE::mRFP (ambos bajo control del promotor *gpdA^{mini}*), siendo alterada en los mutantes W11A y Y85A;V86A de FlbE, y parcialmente alterada en el mutante D70A;D73A (figura 5.4B).

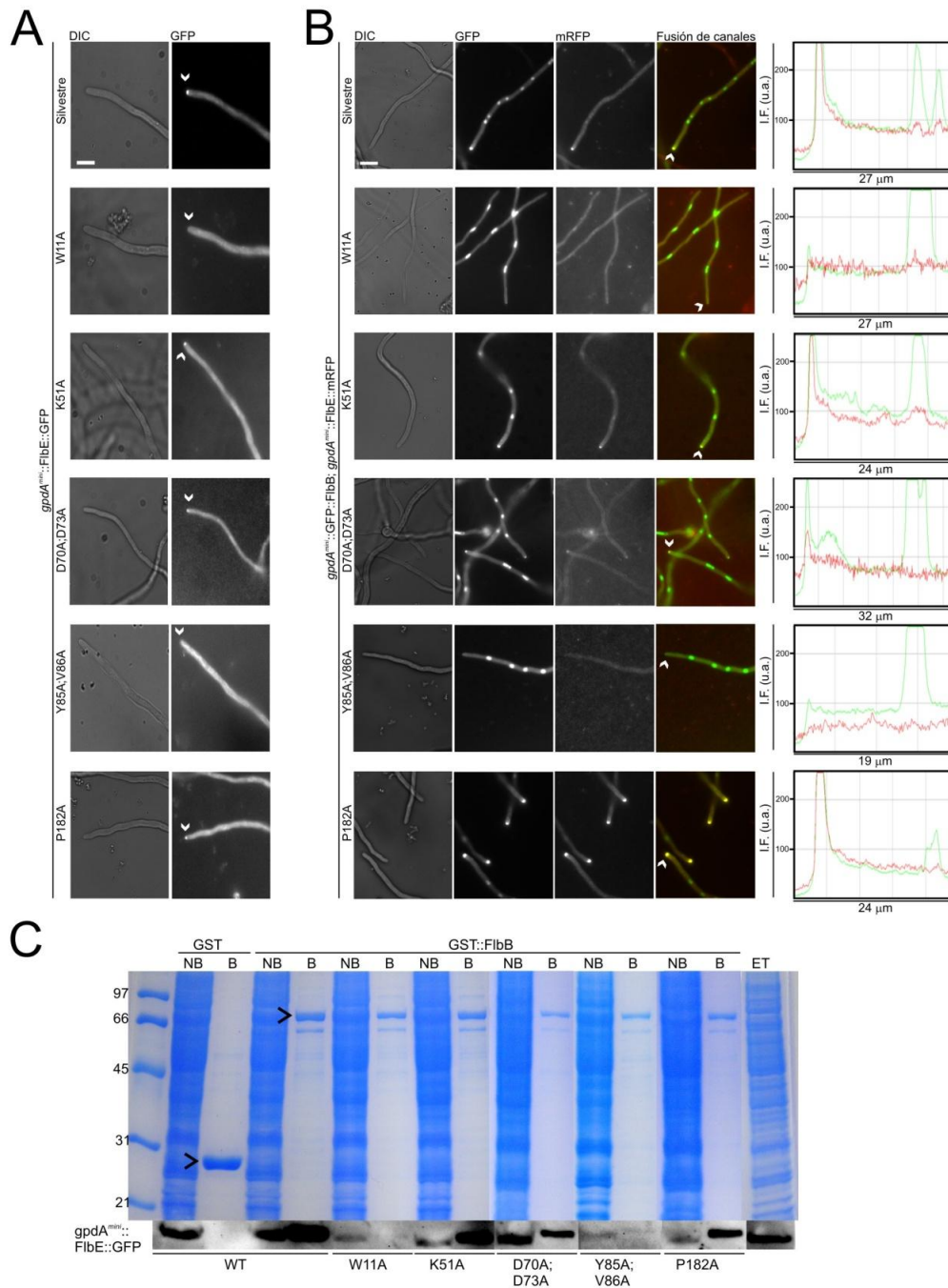


Figura 5.4: Localización subcelular de FlbB y FlbE en hifas vegetativas de los mutantes generados en FlbE. A) Localización subcelular de las quimeras FlbE::GFP silvestre y mutantes (W11A, K51A, D70A;D73A, Y85A;V86A y P182A), todas bajo control de *gpdA^{mini}*, en hifas vegetativas de las cepas correspondientes. Las puntas de flecha indican la punta de las hifas vegetativas. Barra de escala: 5 μ m. **B)** Localización subcelular de las quimeras GFP::FlbB y FlbE::mRFP (silvestre y mutantes), ambas bajo control de *gpdA^{mini}*, en hifas vegetativas de los mismos mutantes analizados en el panel A. Barra de escala: 5 μ m. Los gráficos de la derecha muestran las intensidades de fluorescencia (I.F.) roja y verde (unidades arbitrarias, u.a.) entre la punta y el núcleo apical. Las puntas de flecha indican qué hifas han sido analizadas en los gráficos de la derecha. **C)** Ensayos de retención proteína-proteína entre las formas GST o GST::FlbB y extractos crudos de cepas que expresan formas silvestre o mutantes (W11A, K51A, D70A;D73A, Y85A;V86A y P182A) de FlbE::GFP, en todos los casos bajo control de *gpdA^{mini}*. El gel de poliacrilamida teñido con tinción *Coomassie* se muestra como control de carga. NB: fracción sin unir a la resina (*non-bound fraction*); B: fracción unida a la resina (*bound fraction*); ET: Extracto total.

3.4 Los dominios E1 y E4 de FlbE son necesarios para la interacción con FlbB

Debido a la estrecha dependencia entre las localizaciones apicales de FlbB y FlbE, y su interacción en esta región (Garzia *et al.*, 2009), se analizó también el efecto de cada una de las mutaciones generadas en FlbE sobre la formación del complejo FlbB/FlbE. Para ello, se obtuvieron extractos crudos de proteína de cada uno de los mutantes generados y se utilizaron en ensayos de retención proteína-proteína (*Pull-down*) contra la forma GST::FlbB expresada en *E. coli* (figura 5.4C). Los resultados obtenidos se correlacionan con la localización de FlbE y FlbB descritas para cada uno de los mutantes (ver secciones anteriores). Aquellas mutaciones en FlbE que inhiben la localización apical de FlbE/FlbB también inhiben la interacción *in vitro* con GST::FlbB, mientras que las mutaciones que no inhiben la localización apical, incluyendo las sustituciones D70A;D73A, tampoco inhiben la interacción (figura 5.4C). En los ensayos realizados también se observa que la interacción con FlbB parece estabilizar considerablemente a la proteína FlbE, y que la ausencia de interacción aumenta su degradación. En términos generales, los resultados obtenidos sugieren que los dominios E1 y E4 de FlbE son esenciales para la interacción con FlbB.

3.5 El extremo N-terminal de FlbE es esencial para señalar la conidiación

Considerando la importancia del dominio E1 en la conidiación, localización apical de FlbB y FlbE, y la interacción entre ambos UDAs, se dio paso a un estudio más detallado del extremo amino-terminal de FlbE. Como primera aproximación, se etiquetó la secuencia silvestre de FlbE con GFP en el extremo N-terminal, expresando la quimera bajo control del promotor nativo. La cepa correspondiente mostró, al contrario de la cepa que expresa la quimera FlbE::GFP, un fenotipo aconidial (figura 5.5A), el cual, podría ser consecuencia de una deslocalización de FlbE de la punta de la hifa vegetativa (figura 5.5C). Se observaron los mismos efectos sobre fenotipo y localización subcelular en la cepa que expresa la quimera

FlbE⁽³⁴⁻²⁰¹⁾::GFP, la cual está etiquetada con GFP en el extremo C-terminal pero, carece del dominio E1. No se pudieron detectar las quimeras GFP::FlbE y FlbE⁽³⁴⁻²⁰¹⁾::GFP por *Western-blot* (figura 5.5B), lo que sugiere que ambas formas se generan en menor concentración que la silvestre o tienen una estabilidad menor, tal y como se ha propuesto para las formas mutantes que no se localizan en la punta de la hifa y no interaccionan con FlbB (ver figura 5.4C).

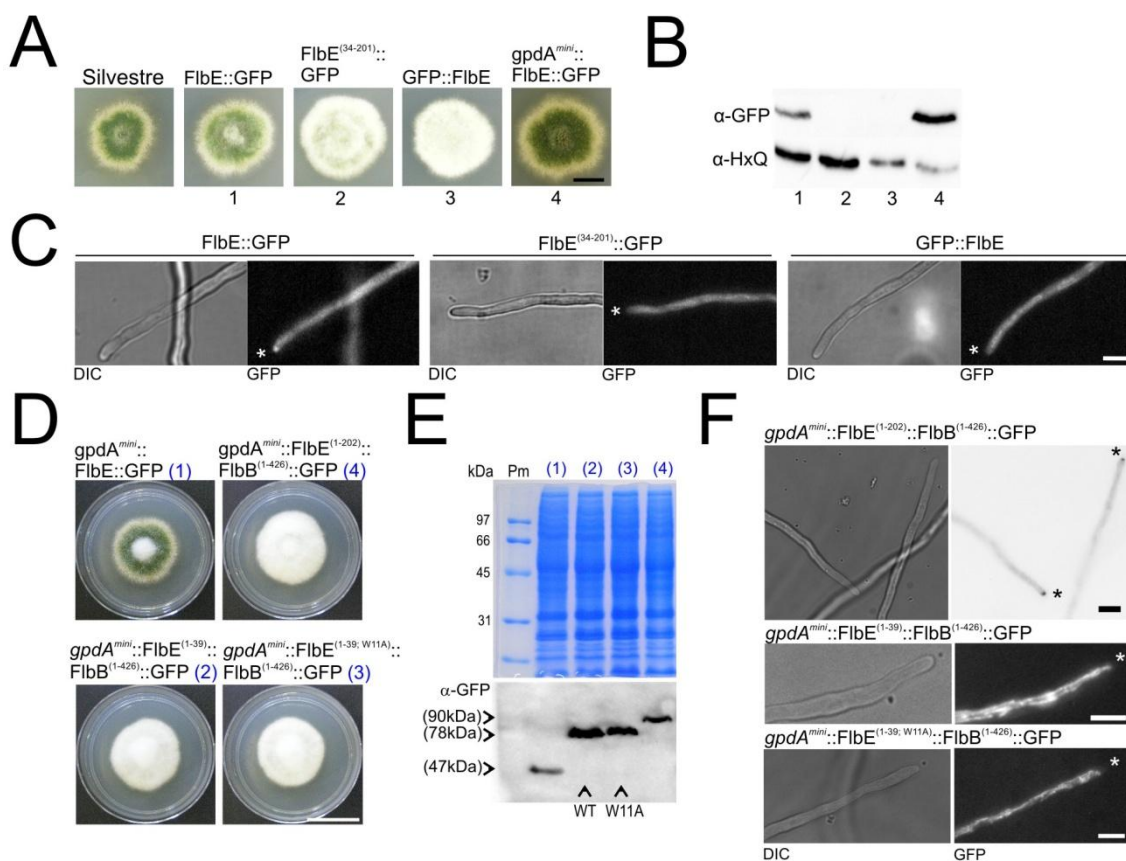


Figura 5.5: Extremo N-terminal de FlbE y su importancia en la localización subcelular de éste y la inducción de la conidiación. **A)** Fenotipo de las cepas silvestre, FlbE::GFP, FlbE⁽³⁴⁻²⁰¹⁾::GFP, GFP::FlbE y *gpdA^{mini}*::FlbE::GFP en MMA después de 48 horas de cultivo a 37 °C. Barra de escala: 1 cm. **B)** *Western-blot* que muestra los niveles de FlbE en extractos crudos de las cepas del panel A. Los niveles de hexoquinasa (HxQ) se muestran como control. **C)** Localización subcelular de las quimeras FlbE::GFP, FlbE⁽³⁴⁻²⁰¹⁾::GFP y GFP::FlbE en hifas vegetativas de *A. nidulans*. Los asteriscos indican la punta de las hifas analizadas. Barra de escala: 5 µm. **D)** Funcionalidad de las distintas quimeras FlbE::FlbB::GFP generadas. Fenotipo de las cepas que expresan las quimeras FlbE⁽¹⁻²⁰²⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP, FlbE⁽¹⁻³⁹⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP o FlbE^(1-39;W11A)::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP, todas ellas bajo control de *gpdA^{mini}*, en MMA después de 72 horas de cultivo a 37 °C. Se utilizó como control la cepa que expresa la quimera FlbE::GFP, también bajo control de *gpdA^{mini}*. Barra de escala: 2 cm. **E)** *Western-blot* que muestra los niveles y la movilidad electroforética de las quimeras expresadas por las cepas del panel D. Como control de carga se muestra el gel de poliácridamida teñido con tinción *Coomassie*. **F)** Localización subcelular de las quimeras FlbE::FlbB::GFP analizadas en los paneles D y E. Los asteriscos indican la punta de las hifas. Barras de escala: 5 µm.

4. La fusión de FlbE y FlbB en una única quimera permite la localización apical pero bloquea la nuclear, inhibiendo la conidiación

Con la intención de profundizar en la función del dominio E1, se analizó si éste era suficiente para permitir la localización apical de FlbB. Para ello, se construyeron tres cepas que expresaban diferentes quimeras de FlbE y FlbB. Dichas quimeras eran la única fuente posible de FlbE y FlbB, ya que, la integración de las construcciones se forzó en el *locus flbE* de una cepa $\Delta flbB$ (ver apartado 5.9 del capítulo 2). La primera de ellas contenía toda la secuencia de aminoácidos de FlbE, FlbE⁽¹⁻²⁰²⁾, unida al extremo N-terminal de FlbB::GFP. La cepa correspondiente será denominada $gpdA^{mini}::FlbE^{(1-202)}::FlbB^{(1-426)}::GFP$. La segunda construcción solamente contenía el dominio E1 de FlbE (aminoácidos 1-39) unido al extremo N-terminal de FlbB::GFP (cepa $gpdA^{mini}::FlbE^{(1-39)}::FlbB^{(1-426)}::GFP$). La tercera quimera era igual a la anterior pero incluía la mutación W11A en el dominio E1 (cepa $gpdA^{mini}::FlbE^{(1-39; W11A)}::FlbB^{(1-426)}::GFP$).

Todos los transformantes obtenidos mostraron un fenotipo aconidial en MMA, al contrario que la cepa de referencia $gpdA^{mini}::FlbE::GFP$ (figura 5.5D). Estos fenotipos no eran consecuencia de una disminución de la concentración de proteína y los experimentos de *Western-blot* mostraron que las quimeras tenían los pesos moleculares previstos (figura 5.5E): 47 kDa para la referencia FlbE::GFP, 90 kDa para FlbE⁽¹⁻²⁰²⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP y 78 kDa para las dos restantes (FlbE⁽¹⁻³⁹⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP y FlbE^(1-39; W11A)::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP). El análisis de la localización subcelular de las quimeras permitió explicar los fenotipos observados. Las quimeras que incluían únicamente el dominio E1 de FlbE, silvestre o mutado, se acumulaban en el citoplasma, describiendo estructuras filamentosas que se parecían a mitocondrias (figura 5.5F) (Savoldi *et al.*, 2008). Ello sugiere que el dominio E1 no es suficiente para el transporte de FlbB a la punta y concuerda con los resultados descritos previamente en este capítulo, los cuales, indican que otras regiones, como el dominio E4, también son esenciales. La quimera con las secuencias completas de FlbE y FlbB se localizaba en la punta de las hifas vegetativas pero, en ningún caso se pudo detectar en los núcleos, a pesar de expresarse bajo control del promotor

constitutivo *gpdA^{mini}* (n = 45 hifas) (figura 5.5F). Los resultados obtenidos en el análisis de esta última construcción apoyan que la quimera FlbE::FlbB::GFP puede adquirir la conformación espacial adecuada que permita su transporte acropetal a la punta de las hifas. Sin embargo, el transporte basipetal a los núcleos parece estar bloqueado, probablemente debido a la incapacidad de separar a FlbE de FlbB o la imposibilidad de incorporarse a su ruta de transporte a causa del elevado tamaño de la quimera. Ello impediría controlar la transcripción de *brlA*.

5. Discusión

En este capítulo se han analizado los dominios E1, E2, E3, E4 y C-terminal de FlbE. Los resultados obtenidos con el mutante P182A de FlbE apoyan la hipótesis de que esta sustitución no afecta a su capacidad para interactuar con FlbB y migrar a la punta. Los alineamientos de los ortólogos de FlbE muestran que el residuo P182 y en general el dominio C-terminal no están conservados (Cortese *et al.*, 2011). Ello explicaría que el etiquetado de FlbE en el extremo C-terminal, tanto en la forma silvestre como en el mutante P182A, no afecte a su función, al contrario de lo que ocurre con el etiquetado en el extremo N-terminal. Los resultados obtenidos también indican que el dominio E3 no es esencial para la localización apical de FlbE y FlbB. Sin embargo, considerando el fenotipo aconidial del mutante D70A;D73A, debería explorarse la posibilidad de que este dominio sea necesario para una supuesta modificación apical de FlbE que inhibiera la interacción con FlbB y permitiera la migración del FT desde la punta al núcleo. Se desconoce, por el momento, si FlbE se ubiquitina o no en el dominio E2, ya que, los resultados obtenidos en este capítulo no permiten obtener conclusión alguna. En cualquier caso, de ser así, podría tener un papel importante en la señalización de la conidiación. Los dominios E1 y E4 son esenciales para localizar a FlbB y FlbE en la punta de las hifas vegetativas y para la interacción entre ambos UDAs. Los resultados que obtuvieron Garzia y colaboradores con las cepas mutantes FlbE::GFP S120P y A131V, cuyas

mutaciones se localizan en las regiones *linker* y E5, respectivamente, muestran que éstas también son necesarias para la localización apical de FlbE. Aunque no se ha realizado la confirmación experimental, estos dominios probablemente participen en la interacción entre FlbB y FlbE. En este apartado se discutirá la posible función de cada uno de los dominios de FlbE analizados y se propondrán diferentes aproximaciones experimentales para confirmar las hipótesis planteadas.

La información que muestran la base de datos AspGD (www.aspgd.com) y el algoritmo SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) permite sugerir que el dominio E1 de FlbE podría actuar como péptido señal. El algoritmo SignalP predice el aminoácido por el que un hipotético péptido señal se escindiría una vez ocurre la translocación de la proteína de nueva síntesis al lumen del RE (Kapp *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 1997). Así, una posibilidad a considerar es que la síntesis y maduración de FlbE se lleve a cabo en el RE, seguido de su transporte al aparato de Golgi y de ahí a la punta de las hifas. Se han caracterizado funcionalmente varias proteínas de *A. nidulans* que participan en los procesos mencionados (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013; Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Pantazopoulou *et al.*, 2014; Pinar *et al.*, 2013b), por lo que podrían ser utilizados como cebos en ensayos de retención proteína-proteína con FlbE. Un ejemplo podrían ser los integrantes de los complejos COPII o TRAPII, complejos proteicos necesarios en el tránsito de vesículas desde el RE al aparato de Golgi, por un lado, o desde el aparato de Golgi hacia la punta, por el otro lado, participando así en el transporte anterógrado de cargos (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013; Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Pinar *et al.*, 2015) (ver capítulo 6).

Los análisis bioinformáticos realizados sugieren que el dominio E4 tiene un papel en el reconocimiento de señales, tal y como se ha descrito para la glucodextranasa con código PDB 1UG9 de la bacteria *Arthrobacter globiformis* (Mizuno *et al.*, 2004). Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,6- α -glucosídicos de los dextranos, liberando residuos de β -D-glucosa

(Mizuno *et al.*, 2004). Ello podría asociar el dominio E4 al reconocimiento o unión de algún tipo de sustrato, quizá en la punta, aunque actualmente no se dispone de ningún tipo de resultado que sustente dicha hipótesis. Los experimentos realizados con la forma mutante que incluye las sustituciones Y85A;V86A, sin embargo, muestran que esta región es necesaria para la localización apical de FlbE e interacción con FlbB, lo cual, asociaría la función de este dominio a la interacción con algún tipo de proteína necesaria para el transporte del complejo señalizador. Una tercera posibilidad no explorada aún es que el dominio E4 permita la unión a algún tipo de glicoproteína o glicolípido de las vesículas que hipotéticamente transportarían el complejo señalizador hacia la punta.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la quimera FlbE⁽¹⁻²⁰²⁾::FlbB⁽¹⁻⁴²⁶⁾::GFP indican que dicha construcción es capaz de acumularse en la punta pero no puede migrar a los núcleos y activar la transcripción de *brlA*. Ello podría indicar, por ejemplo, que la interacción entre FlbB y FlbE debe ser inhibida para poder iniciar el transporte basipetal. Un experimento que contribuiría a confirmar o desechar esta posibilidad sería generar la misma construcción pero, insertando entre FlbE y FlbB la secuencia correspondiente a T2A, que es un péptido de origen vírico que durante la traducción provoca el truncamiento de la cadena peptídica que se está sintetizando pero, sin interrumpir la propia traducción (Arribere *et al.*, 2016). De este modo, se generarían dos péptidos, uno con la secuencia hasta el péptido T2A (correspondiente a FlbE, con o sin epítipo fluorescente) y otro desde ahí hasta el último aminoácido (quimera de FlbB y proteína fluorescente). Si la hipótesis planteada es correcta, FlbB debería volver a acumularse, además de en la punta, en los núcleos y ser capaz de inducir la conidiación. No obstante, existen otras posibilidades a tener en cuenta, como que el tamaño de la quimera formada entre FlbB y FlbE impidiera que FlbB se integrara en el sistema de transporte basipetal. La identificación de interactores de FlbB necesarios para el transporte basipetal permitiría analizar si la quimera FlbE::FlbB::GFP es capaz de interactuar con ellos.

En cualquier caso, el inicio del transporte basipetal de FlbB podría ser causado por una modificación en FlbB y/o FlbE. En el caso de FlbE, podría haber un cambio conformacional que, basándose en los resultados experimentales y las predicciones bioinformáticas, ocurriera en los dominios E2 y E3. Una posibilidad a considerar sería que este hipotético cambio conformacional estuviera relacionado con la presencia de una hélice de poliprolina en el dominio E3. Las hélices de poliprolina participan en el mantenimiento de la estructura tridimensional de proteínas e intervienen en funciones biológicas específicas (Adzhubei *et al.*, 2013). Una de las características más relevante de las hélices de poliprolina es su flexibilidad y su función en la interacción con otras proteínas (Bochicchio y Tamburro, 2002). En el caso del dominio E3 de FlbE, la mutación D70A;D73A no inhibe la localización apical de FlbB o FlbE ni la interacción entre ellos, pero, sí la conidiación. Aunque esta fracción de FlbE se localice en la punta de las hifas vegetativas, no es suficiente para inducir la conidiación. Sin embargo, en este trabajo se ha estudiado la localización subcelular de una forma GFP::FlbB expresada constitutivamente, la cual, no es la mejor opción para analizar el efecto de las mutaciones estudiadas en la localización nuclear de FlbB, ya que, gran parte de la población nuclear de FlbB no ha pasado por la punta y en principio no es activa para inducir la expresión de *brlA* (Herrero-García *et al.*, 2015). Así, convendría estudiar la localización nuclear de una quimera GFP::FlbB, expresada bajo control del promotor nativo, al mutar a alaninas los residuos de ácido aspártico de las posiciones 70 y 73 de FlbE.

La supuesta disminución en la estabilidad de FlbE observada al no interactuar con FlbB también podría estar relacionada con la hipótesis planteada. Es decir, una modificación en FlbE podría causar la inhibición de la interacción entre ambos UDAs y la degradación de FlbE. La lisina de la posición 51 (dominio E2) podría jugar un papel clave en este proceso, debido a su probable ubiquitinación (Chu *et al.*, 2016). Ésta es una modificación postraduccional (MPT) en la que la ubiquitina forma un enlace amida con una lisina de la proteína modificada (Chen *et al.*, 2013). La ubiquitinación tiene un papel importante en distintos procesos de células

eucariotas, ya que, puede alterar la actividad, las interacciones y las localizaciones subcelulares de proteínas (Schnell y Hicke, 2003). En *Aspergillus nidulans* parece estar estrechamente relacionada con las proteínas que controlan el crecimiento de las hifas (Chu *et al.*, 2016). Se ha descrito también que la ubiquitinación está asociada a la respuesta a estrés (Noventa-Jordão *et al.*, 2000), así como a la respuesta adaptativa al pH del entorno (Hervás-Aguilar *et al.*, 2010). Sin embargo, la sustitución del residuo de lisina en la posición 51 de FlbE por alanina no produjo cambios en el fenotipo o en la localización subcelular de FlbB o FlbE. No obstante, se ha descrito que el estudio de la ubiquitinación conlleva problemas experimentales dado que se trata de un proceso dinámico. En el caso de FlbE, al estar la lisina 51 sustituida por una alanina, la proteína podría ser ubiquitinada en otra de las seis lisinas adicionales que se encuentran en su secuencia (Ugo Mayor, UPV/EHU, comunicación personal). Un abordaje experimental posible para ver si la ubiquitinación puede estar relacionada con la dinámica y actividad de FlbE, sería primero generar una cepa que expresara las quimeras $gpdA^{mini}::HA::Ubi4$ (Hervás-Aguilar *et al.*, 2010) y $gpdA^{mini}::FlbE::GFP$. Utilizando como cebo la quimera FlbE::GFP en experimentos de *Pull-down* (Noventa-Jordão *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2016), se vería si ésta es capaz de retener a HA::Ubi4. El uso de formas mutantes de FlbE en los dominios E1, E3 o E4 contribuiría a conocer si la ubiquitinación aumenta o disminuye con la localización apical de FlbB y FlbE.

Los resultados obtenidos en este y anteriores trabajos (Herrero-García *et al.*, 2015; Oartzabal-Arano *et al.*, 2015) sugieren que hay un control espacial y temporal específico de las interacciones que ocurren en 1) el transporte acropetal de FlbB y FlbE, 2) su acumulación en la punta de las hifas vegetativas y 3) el transporte basipetal desde la punta hacia los núcleos. En la discusión general (capítulo 6) se presentará un modelo que integre en espacio y tiempo todos estos sucesos y se propondrán posibles aproximaciones para poder confirmar experimentalmente las hipótesis planteadas.

CAPÍTULO 6: Discusión general

DISCUSIÓN GENERAL

De las dos rutas principales de control de la conidiación en *Aspergillus nidulans*, UDA y CDP, este proyecto de tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la primera, la cual, entre otras funciones, se encarga de dar respuesta a las señales inductoras que recibe el hongo. La ruta UDA se divide al menos en tres subrutas, mediadas por FlbC, FlbA y FlbB/E/D, respectivamente (ver capítulo 1). Este trabajo ha analizado aspectos determinados de la subruta definida por FlbB/E/D, dando continuidad así al trabajo que ha venido realizando el grupo de acogida de la doctoranda.

Los resultados obtenidos en este campo permiten sugerir que la importancia de la subruta definida por FlbB, FlbD y FlbE en la inducción de la conidiación se debe a una función sensora en la punta de las hifas vegetativas y transcripcional en el núcleo, donde en colaboración con otros FTTT, FlbB y FlbD controlan la expresión de *brlA* (Garzia *et al.*, 2010), y con ello, la actividad de la ruta CDP. Este mecanismo de transducción y regulación transcripcional depende en gran medida de la dinámica subcelular de FlbB, el cual, tal y como se ha demostrado en este trabajo, es transportado en primer lugar a la punta de las hifas para ser posteriormente importado al núcleo. Esta secuencia de acontecimientos es esencial para que FlbB pueda desempeñar su función transcripcional en el núcleo correctamente (Herrero-García *et al.*, 2015). Tanto FlbE como FlbD presentan una estrecha relación funcional con FlbB pero, diferenciadas claramente en espacio y tiempo. FlbB y FlbE presentan una elevada afinidad el uno por el otro. Esta interacción, junto con otros requerimientos que se discutirán a lo largo de este capítulo, permite el transporte al ápice.

Sin embargo, la interacción entre FlbB y FlbE parece limitarse a esta etapa de transporte acropetal y no ser necesaria para el basipetal. Es entonces cuando cobraría importancia la actividad del segundo regulador transcripcional de esta sub-ruta, FlbD, permitiendo la acumulación nuclear y el control coordinado de la expresión de *brlA*

(Oartzabal-Arano, 2016). La secuencia de eventos descrita se recoge en el modelo de la figura 6.1 y servirá para articular los puntos a discutir en este capítulo.

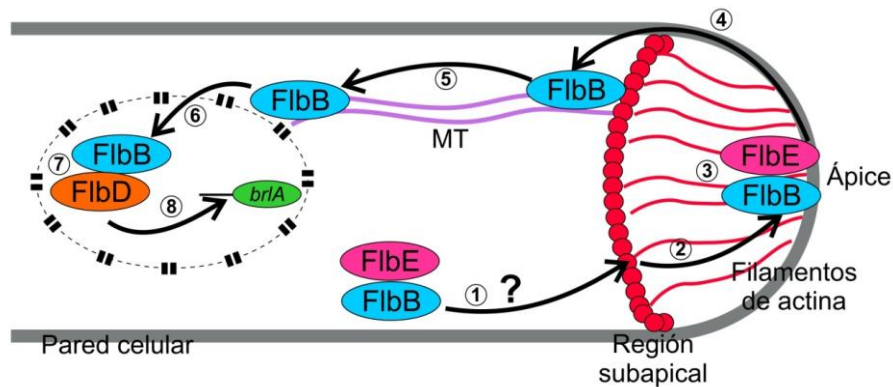


Figura 6.1: Modelo que representa las distintas etapas en el transporte acropetal y basipetal de FlbB en hifas vegetativas. 1) Transporte acropetal de FlbB y FlbE hasta la región subapical, 2) transporte del supápice al ápice, el cual es actino-dependiente, 3) desempeño de una hipotética función sensora, 4) inhibición de la interacción entre FlbB y FlbE e inicio del transporte basipetal, 5) transporte de FlbB hacia el núcleo, el cual parece ser microtúbulo-dependiente (MT), 6) importación de FlbB al núcleo, 7) interacción entre FlbB y FlbD, 8) unión de FlbB y FlbD al promotor de *brlA* y control de la conidiación. El modelo ha sido propuesto en base a los resultados presentados en esta tesis doctoral y trabajos anteriores (Garzia *et al.*, 2009; Garzia *et al.*, 2010; Herrero-García *et al.*, 2015; Oartzabal-Arano *et al.*, 2016).

1. Transporte acropetal de FlbB y FlbE

El modelo de la figura 6.1 divide el transporte acropetal de FlbB y FlbE en dos etapas generales, transporte hasta el subápice, en primer lugar, y desde ahí hasta el ápice en segundo lugar. Para facilitar la lectura, este primer punto se ha dividido en dos secciones. La primera discute el itinerario que podrían seguir FlbB y FlbE en su transporte hasta el ápice y las aproximaciones experimentales que podrían utilizarse para estudiarlo, mientras que la segunda se centra en discutir el papel del citoesqueleto en dicho transporte.

1.1 Posibles itinerarios de transporte acropetal de FlbB y FlbE

Se conocen dos mecanismos principales de transporte acropetal de proteínas en hifas. El primero de ellos sería el transporte del ARNm correspondiente en endosomas tempranos (*early endosomes*, EE) a lo largo de microtúbulos. En este caso, el modelo aceptado describe que la traducción del ARNm puede darse durante el propio transporte (Jansen *et al.*, 2014). El segundo mecanismo, compatible con el primero, es el tránsito de proteínas a través de la ruta

de secreción. Este proceso consta básicamente de 3 pasos en hifas de *A. nidulans* (ver capítulo 1): 1) la translocación de la proteína de nueva síntesis al lumen del RE (Schalén *et al.*, 2016), donde sufre distintas MPTs, 2) transporte vesicular del RE al aparato de Golgi, donde se continúa con la modificación de los cargos y además tiene lugar su clasificación en vesículas de secreción y 3) transporte vesicular desde el aparato de Golgi al ápice de la punta.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral no permiten determinar cuál de los dos mecanismos principales de transporte acropetal de cargos es el que media la acumulación apical de FlbB y FlbE. Jansen y colaboradores describieron que el transporte de ARNm y su traducción “*on-the-move*” (opción A en la figura 6.2) es microtúbulo-dependiente (Jansen *et al.*, 2014). Sin embargo, los análisis realizados muestran claramente que los microtúbulos tienen un papel menor en el transporte acropetal de FlbB y FlbE, y que son los filamentos de actina los que sí juegan un papel esencial, pero, entre subápice y ápice (ver sección 1.2) (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-García *et al.*, 2015). Estudios previos realizados en *Saccharomyces cerevisiae* mostraron la existencia de mecanismos de transporte de ARNm a través de filamentos de actina durante la gemación (Zarnack y Feldbrügge, 2010). Sin embargo, existen claras diferencias en la distribución de microtúbulos y filamentos de actina durante la gemación en *S. cerevisiae* y el crecimiento polar activo de la hifa de *A. nidulans* (Slaughter *et al.*, 2009; Thompson, 2013). En *S. cerevisiae*, los microtúbulos están más desplazados hacia la célula madre que hacia la gema durante la mitosis (Winey y O'Toole, 2001). Los filamentos de actina, no obstante, se nuclean desde la región de crecimiento de la gema y se extienden hacia la célula madre (Pearson y Bloom, 2004). Así, ASH1 es un FT tipo GATA necesario para el control de la gemación. Su ARNm es transportado hacia la punta de la gema a lo largo de los filamentos de actina por la miosina V, Myo4p, para ser traducido localmente y desempeñar su función en el núcleo que entrará en la gema (Zarnack y Feldbrügge, 2010). Los análisis llevados a cabo por el grupo de Feldbrügge en *U. maydis* sugieren, sin embargo, que los filamentos de actina no participan en el transporte de ARNm (Becht *et al.*, 2006). En cualquier caso, sería

interesante analizar la localización y dinámica de los ARNm-s de *flbB* y *flbE* para saber hasta dónde tiene lugar y en qué región de la hifa podría darse su traducción. Para ello se podría utilizar el procedimiento seguido por Baumann y colaboradores (Baumann *et al.*, 2014; Baumann *et al.*, 2015), quienes describieron la dinámica del ARNm de *cdc3*, el cual da lugar a una septina que participa en la citoquinesis. El ARNm de *cdc3* es transportado por endosomas tempranos y la unión entre ambos elementos está mediada por la proteína de unión a ARN Rrm4 (Baumann *et al.*, 2015). Para analizar *in vivo* la dinámica del ARNm de *cdc3* mediante microscopía de fluorescencia, los autores generaron una cepa que expresara en el *locus ip^s* la secuencia correspondiente a la fusión YN*-GFP² (proteína N del bacteriófago λ unida a dos copias del epítipo GFP) bajo el promotor inducible de *crg1* (gen que participa en la producción de arabinosa). Por otro lado, insertaron la secuencia de *boxB* (ARN que tiene la característica forma de U conocida como *hairpin*) en el extremo 3'-UTR del ARNm de interés (*cdc3*). La proteína N del bacteriófago λ forma enlace con *boxB* debido a la singular conformación de este último, permitiendo la visualización del ARNm gracias al epítipo GFP (Baumann *et al.*, 2015).

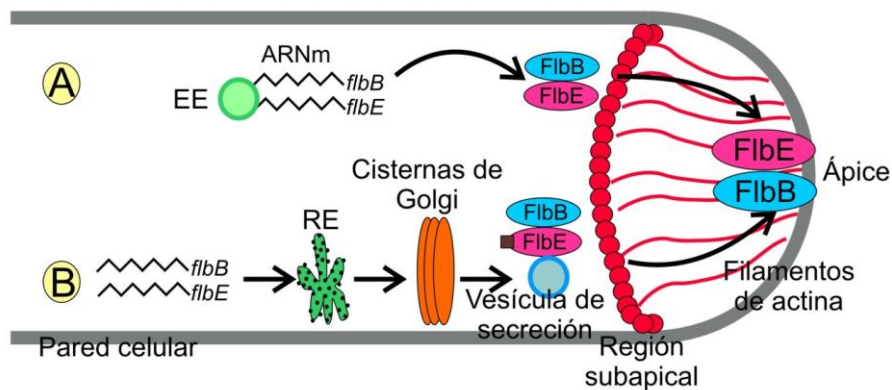


Figura 6.2: Modelo que representa las etapas generales de los posibles mecanismos de transporte acropetal de FlibB y FlibE. A) Los ARNm-s de *flbB* y *flbE* serían transportados a través endosomas tempranos (EE), donde al mismo tiempo se daría su traducción. **B)** La segunda opción muestra el posible transporte de FlibB y FlibE a través de la ruta de secreción. En un primer paso se da la translocación de FlibB/E de nueva síntesis al lumen del RE, donde podrían ser modificados y desde donde serían transportados hacia el aparato de Golgi. En este orgánulo, las proteínas podrían sufrir MPTs adicionales, serían clasificadas en vesículas y transportadas hacia el ápice. El transporte del subápice al ápice estaría mediado por los filamentos de actina.

El transporte a través de la ruta de secreción parece, *a priori*, una opción más viable para FlibB y FlibE (opción B en la figura 6.2), aunque debe tenerse en cuenta que para

incorporarse a ella, los ARNm-s de *flbB* y *flbE* deberían llegar hasta los ribosomas de la membrana del RE. Análisis bioinformáticos preliminares sugieren que FlbE contiene un péptido señal en su secuencia (dominio E1), lo cual, apoyaría esta segunda opción (ver capítulo 5).

Existen marcadores de cada una de las 3 etapas principales de la ruta de secreción de *A. nidulans*, por lo que podrían ser utilizados para determinar si FlbB y FlbE son cargos de esta ruta. Debido al efecto pleiotrópico o letal que tiene en la mayoría de los casos la delección de los genes correspondientes, el análisis de la localización subcelular de FlbB y FlbE en sus fondos nulos no sería conveniente, ya que, de confirmar un cambio en la localización apical de ambos UDAs, ello podría deberse a un efecto indirecto. Sí sería conveniente el uso de mutaciones termosensibles o el uso de promotores inducibles en los casos en los que éstos estén disponibles. Otro abordaje experimental posible sería la realización de ensayos de retención proteína-proteína entre FlbB/E y marcadores de la ruta de secreción que se presentan a continuación.

En el caso del RE (primer paso en la ruta de secreción) se diferencian dos procesos principales: entrada (*early-ER* o RE temprano) y salida (*late-ER* o RE tardío) (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013). Sec63 marca la entrada al lumen del RE, ya que forma parte del translocón (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013). Sec23, por otro lado, forma parte del complejo COPII que media el transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi (RE tardío) (Duden, 2003; Pantazopoulou y Peñalva, 2009). Sec23::GFP se localiza a lo largo del citoplasma y esta localización no se ve afectada por la adición de la Brefeldina A (BFA), droga que supuestamente inhibiría el transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi (Sciaky *et al.*, 1997). Debido a esta aparente contradicción, los autores propusieron que BFA tiene un efecto exclusivo sobre el aparato de Golgi. Ello sugeriría al mismo tiempo, que Sec23 no se requeriría en la formación del Golgi temprano. Así, una aproximación interesante para estudiar si FlbB y FlbE pudieran ser transportados en la ruta de secreción a través del aparato de Golgi

sería observar si hay modificaciones en su localización apical tras la adición de esta droga. En caso de que ésta se viera afectada sugeriría que ambos transitan a través de este orgánulo. El mantenimiento de la localización apical en presencia de BFA, en cambio, podría abrir la puerta a un mecanismo de transporte independiente del aparato de Golgi, tal y como ha sido descrito para cargos de distinta tipología (ver, a modo de ejemplo, (Grieve y Rabouille, 2011; Nickel y Seedorf, 2008; Nickel y Rabouille, 2009)).

Se han empleado marcadores adicionales para analizar la función del aparato de Golgi, tales como CopA, RabO o PH^{OSBP}, entre otros (Breakspear *et al.*, 2007; Pantazopoulou y Peñalva, 2009; Pinar *et al.*, 2013a). CopA ha sido descrito como componente del complejo COPI en *A. nidulans* (Breakspear *et al.*, 2007). RabO, por su parte, se localiza en las distintas cisternas del aparato de Golgi (Pinar *et al.*, 2013a), mientras que PH^{OSBP} se localiza en las membranas del *trans*-Golgi (Pantazopoulou y Peñalva, 2009). Combinando los marcadores descritos, es posible diferenciar claramente los distintos tipos de membranas que componen el aparato de Golgi (temprano-*early*, intermedio-*trans* y tardío-*late*) (Pantazopoulou y Peñalva, 2009).

Por último, el complejo proteico TRAPII regula la salida de las vesículas exocíticas del Golgi tardío (Pinar *et al.*, 2015). Uno de los componentes de TRAPII es HypA, el cual colocaliza con la GTPasa RabE en el aparato de Golgi (Pinar *et al.*, 2015). RabE forma parte de las vesículas exocíticas o vesículas de secreción y es transportada a través de microtúbulos hasta la región subapical y después a través de filamentos de actina hasta el ápice (Pantazopoulou *et al.*, 2014). Para su localización apical, RabE requiere la actividad motora de MyoE. Así, en el mutante nulo de *myoE* RabE forma dos acumulaciones a ambos lados del ápice, tal y como se ha observado también en el caso de FlbB (ver capítulo 3).

En términos generales, la combinación de estos marcadores en ensayos de retención proteína-proteína permitiría trazar el itinerario de FlbB y FlbE en su transporte acropetal hacia

el ápice. Alternativamente, FlbB y/o FlbE podrían ser utilizados como cebo en estos ensayos, realizando la identificación de los posibles interactores mediante espectrometría de masas.

1.2 Papel del citoesqueleto

Los resultados obtenidos han permitido diferenciar dos etapas generales de transporte acropetal de FlbB y FlbE, una primera hasta el subápice y una segunda desde esta región hasta el ápice (pasos 1 y 2 en figura 6.1, respectivamente) (Herrero-García *et al.*, 2015). Estas dos etapas están probablemente controladas por mecanismos moleculares en los que los citoesqueletos desempeñan funciones diferentes. En presencia de benomilo, FlbB se acumula en el ápice, lo cual implica que ha llegado previamente hasta el subápice. Si se considera que el benomilo despolimeriza todos los microtúbulos, cabe pensar que previamente ha llegado al subápice a través de un mecanismo de transporte diferente. Schultzhaus y colaboradores han revelado en *A. nidulans* la existencia de una subpoblación de cables de actina distinta a los localizados entre subápice y ápice (Schultzhaus *et al.*, 2016). Esta segunda población de cables de actina se localiza a una distancia mayor del punto de crecimiento (aproximadamente a 18 μm) y, aunque los autores desconocen su punto de nucleación, describieron que las hifas con mayor cantidad de esta segunda población de cables de actina tienen una velocidad de crecimiento superior (Schultzhaus *et al.*, 2016). Trabajos adicionales también han propuesto la existencia de cables de actina de mayor longitud (Berepiki *et al.*, 2011; Bergs *et al.*, 2016). Así, una posibilidad es que la primera etapa de transporte acropetal dependa realmente de los microtúbulos y una quinesina cuya naturaleza es desconocida aún. En un medio con benomilo, podría ser esta segunda población de cables de actina la responsable de la acumulación apical de FlbB.

2. Modelando la interacción entre FlbB y FlbE

FlbB y FlbE emplean distintos dominios para interactuar entre sí y acumularse en el ápice de las hifas vegetativas (pasos 1, 2 y 3 en figura 6.1). Varios de estos dominios han sido identificados y caracterizados de forma preliminar en este trabajo y los previamente realizados por el grupo de acogida de la doctoranda (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-García *et al.*, 2015). Así, cabe distinguir dos tipos de dominios entre aquellos necesarios para la acumulación apical: los que son esenciales para la interacción entre ambos UDAs, y los que no parecen serlo. Estos últimos podrían contribuir al establecimiento de una estructura tridimensional específica que permitiera el transporte acropetal.

El dominio de dimerización dentro de la cremallera de leucina de FlbB es el ejemplo más representativo del primer grupo de dominios, ya que es necesario y suficiente para que FlbB interactúe con FlbE. Además, los experimentos realizados con el mutante puntual en este dominio permiten sugerir que FlbB no forma homodímeros y que el transporte acropetal se da en forma de heterodímero con FlbE (Herrero-García *et al.*, 2015). El extremo C-terminal, sin embargo, no es esencial para la interacción con FlbE (Herrero-García *et al.*, 2015) y un análisis preliminar de las 6 cisteínas de FlbB permite sugerir que sólo aquellas en las posiciones 272 y 382 son necesarias para la localización apical de FlbB. Tal y como se discute en el capítulo 4, estos residuos de cisteína y las hipotéticas MPTs asociadas a ellas, podrían ser importantes para establecer una estructura tridimensional específica que el complejo FlbB/FlbE requiere para incorporarse a su ruta de transporte. En este trabajo se ha intentado realizar una primera aproximación experimental para analizar si las cisteínas en las posiciones 272 y 382 pudieran participar en la formación de un puente disulfuro pero, la ausencia de un control positivo no permite obtener resultados concluyentes al respecto.

Existen distintas formas de analizar MPTs en residuos de cisteína pero todas pasan por la disponibilidad de un control positivo adecuado. Se podría intentar utilizar An7513/NapA

(Asano *et al.*, 2007), el FT tipo AP-1 de *A. nidulans*, ya que, aunque no ha sido analizada todavía la formación de puentes disulfuro en esta proteína, modifica su localización subcelular desde el citoplasma al núcleo al añadir H₂O₂ al medio de cultivo (Mendoza-Martínez *et al.*, 2017). Otra posibilidad sería utilizar el propio Pap1 (*S. pombe*) como control, ya que, sus puentes disulfuro y los residuos de cisteína que participan en ellos bajo diferentes condiciones han sido ampliamente estudiados (Castillo *et al.*, 2002; Vivancos *et al.*, 2004). Sin embargo, al tratarse de un sistema diferente a *A. nidulans* y no filamentoso, los procedimientos de extracción y alquilación podrían variar y requerirse diferentes condiciones en cada caso, lo cual, complicaría la obtención de resultados fiables. El empleo de aproximaciones químicas sería otra posibilidad. Este tipo de técnicas vienen utilizándose durante varias décadas (Murray y Van Eyk, 2012) e incluyen el empleo de electroforesis bidimensional (2DE) y espectrometría de masas (ICAT, *Isotope Coded Affinity Tags*), entre otros (Couvertier *et al.*, 2014). En este último caso, y considerando que las cisteínas sufren modificaciones químicas al añadir grupos que contienen isótopos específicos, esta técnica detecta dichos cambios y diferencia cada tipo de isótopo, de modo que permitiría identificar la forma redox en la que se encuentran las cisteínas de FlbB.

En cuanto a FlbE, además del dominio E1 mencionado en la sección anterior, el dominio E4 también es esencial para la acumulación apical y la interacción con FlbB. Sin embargo, los resultados sugieren que el dominio E3 no es esencial para estos dos procesos. Tal y como se propone en la discusión del capítulo anterior, una posibilidad a estudiar es que fuera necesario para la acumulación nuclear de FlbB, para lo cual habría que expresar GFP::FlbB bajo promotor nativo en el mutante FlbE^(D70A;D73A). En esa misma sección también se proponen aproximaciones experimentales para analizar si la ubiquitinación puede tener algún papel en la localización subcelular de FlbE y FlbB. Todas estas cuestiones ayudarán a determinar cuál es el papel de FlbE en el control de la dinámica y la actividad de FlbB.

3. Transporte basipetal y acumulación de FlbB en el núcleo

El primer paso en el transporte basipetal de FlbB debería ser su introducción en la ruta correspondiente. Si el movimiento citoplásmico que describe FlbB en un fondo genético $\Delta flbD$ depende de los microtúbulos (Oartzabal-Arano, 2016), esta región probablemente se corresponda con la zona de carga de la dineína (anillo subapical) (Abenza *et al.*, 2009). Además, en la figura 3.2 del capítulo 3 se muestran varios agregados de FlbB que parecen interiorizarse en la región subapical justo antes de comenzar con su transporte basipetal.

Se ha propuesto la existencia de al menos dos mecanismos principales de endocitosis en el anillo subapical de *A. nidulans*. El primero se realiza a través del complejo AP-2, el cual desempeñaría su función de forma independiente a la clatrina (Martzoukou *et al.*, 2017). En el segundo participarían marcadores como la proteína v-SNARE SynA, y las proteínas de unión a actina AbpA y SlaB. Experimentos de retención de proteína-proteína entre FlbB y ApbS (la subunidad σ del complejo AP-2 en *A. nidulans*) sugieren que no hay interacción entre ambos, por lo que el complejo AP-2 no sería necesario para una supuesta endocitosis de FlbB (A. Otamendi, resultados no publicados). Así, sería interesante analizar si este proceso pudiera llevarse a cabo a través del segundo mecanismo mencionado previamente. Una aproximación experimental posible para analizarlo sería realizar ensayos de retención proteína-proteína entre FlbB y SynA, SlaB o AbpA.

Una vez incorporado a su ruta de transporte, la migración de FlbB al núcleo se podría dividir en dos etapas, un primer transporte basipetal desde la punta hasta la periferia nuclear y después la importación y acumulación en el núcleo (pasos 5 y 6 en la figura 6.1, respectivamente) (Oartzabal-Arano, 2016). FlbB necesita una señal de localización nuclear bipartita consenso (NLS) para acumularse en el núcleo (Herrero-García *et al.*, 2015). Ello abre la puerta a la necesidad de las importinas α/β , KapA y KapB (Etxebeste *et al.*, 2013), para la importación nuclear. Según el modelo establecido, sería la importina- α la que reconocería la

NLS del cargo, haciendo de puente con la importina- β (Cingolani *et al.*, 1999). KapA y KapB se mueven, además, bidireccionalmente entre ápice y zonas distales (Etxebeste *et al.*, 2013). Este movimiento depende de los microtúbulos y, en el caso de transporte basipetal, de la dineína. Considerando todo ello, sería interesante estudiar la posibilidad de interacción entre FlbB y KapA, la cual debería inhibirse en el mutante NLS de FlbB.

El movimiento basipetal de KapA queda inhibido en un fondo *nudA1* y a la temperatura restrictiva de 42 °C (mutación termosensible; (Etxebeste *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 1994)). *nudA* codifica la cadena pesada de la dineína (Efimov, 2003). Se dispone de una cepa que expresa la quimera FlbB::GFP en este fondo genético (Dra. Erika Herrero-García, resultados sin publicar). Sin embargo, la localización nuclear de FlbB::GFP queda inhibida en el fondo silvestre a 42 °C, por lo que no se pudo analizar el efecto de la mutación *nudA1*. Recientemente ha sido descrito que el fenotipo *nudA1* también se manifiesta a 37 °C (Peñalva *et al.*, 2017), temperatura a la que FlbB sí se localiza en los núcleos (Etxebeste *et al.*, 2008). Por ello, sería conveniente realizar de nuevo este experimento.

Por último, la acumulación nuclear de FlbB depende también de FlbD (Oartzabal-Arano, 2016) y la acción coordinada de ambos en el promotor de *brlA* (pasos 7 y 8 en figura 6.1, respectivamente), junto con la de otros activadores e inhibidores de la conidiación, controla este proceso (Garzia *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016).

En resumen, la acción coordinada de FlbB, FlbE y FlbD en espacio y tiempo constituye uno de los mecanismos principales de control de la conidiación en *A. nidulans*. Los experimentos planteados en este capítulo proporcionan una base experimental que debería permitir obtener información detallada sobre los mecanismos de transporte, interacción y señalización en los que participan estas tres proteínas inductoras.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. FlbB sigue una dinámica muy específica en las hifas vegetativas, siendo transportado primero a la punta y después al núcleo. Esta direccionalidad es clave para la inducción de la conidiación.
2. FlbE es un elemento esencial en el transporte acropetal y acumulación apical de FlbB. Resultados previos del grupo de investigación han mostrado que FlbD es necesario para su acumulación nuclear y actividad transcripcional.
3. Dominios específicos de FlbB median su acumulación apical. Por un lado, el dominio DIM es necesario y suficiente para interactuar con FlbE. Por otro lado, cisteínas específicas de la región central y C-terminal, C272 y C382, no son esenciales para dicha interacción.
4. Mutaciones en los dominios E1 y E4 de FlbE causan una inhibición de la conidiación, la interacción entre FlbB y FlbE y, por tanto, de su acumulación apical. El dominio E3 no parece ser esencial para la interacción y la localización apical de ambos UDAs pero, sí para inducir la conidiación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Adzhubei, A.A., Sternberg, M.J., y Makarov, A.A. (2013) Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *J Mol Biol* **425**: 2100-2132.

Affeldt, K.J., Brodhagen, M., y Keller, N.P. (2012) *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on g protein-coupled receptors. *Toxins (Basel)* **4**: 695-717.

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

Amoutzias, G.D., Bornberg-Bauer, E., Oliver, S.G. y Robertson, D.L. (2006) Reduction/oxidation-phosphorylation control of DNA binding in the bZIP dimerization network. *BMC Genomics* **7**: 107.

Amoutzias, G.D., Robertson, D.L., Van de Peer, Y. y Oliver, S.G. (2008) Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem Sci* **33**: 220-229.

Andersen, M.R. (2014) Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: orphaned research in characterizing orphan genes. *Brief Funct Genomics* **13**: 451-455.

Andrianopoulos, A. y Timberlake, W.E. (1994) The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**: 2503-2515.

Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A. y 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.

Arribere, J.A., Cenik, E.S., Jain, N., Hess, G.T., Lee, C.H., Bassik, M.C. y Fire, A.Z. (2016) Translation readthrough mitigation. *Nature* **534**: 719-723.

Asai, D.J. y Koonce, M.P. (2001) The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol* **11**: 196-202.

Asano, Y., Hagiwara, D., Yamashino, T. y 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.

Atoui, A., Kastner, C., Larey, C.M., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E.A. *et al.* (2010) Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 962-972.

Baker, S.M., Buckheit III, R.W. y Falk, M.M. (2010) Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol* **11**: 15.

Bartnicki-García, S., Bartnicki, D. y Gierz, G. (1995) Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Canadian Journal of Botany* **73**: 372-378.

Baumann, S., König, J., Koepke, J. y Feldbrügge, M. (2014) Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep* **15**: 94-102.

Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. y Feldbrügge, M. (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**: 2740-2752.

Baumann, S., Takeshita, N., Grun, N., Fischer, R. y Feldbrügge, M. (2015) Live cell imaging of endosomal trafficking in fungi. *Methods Mol Biol* **1270**: 347-363.

Bayram, O., Braus, G.H., Fischer, R. y Rodríguez-Romero, J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**: 900-908.

Becht, P., König, J. y Feldbrügge, M. (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**: 4964-4973.

Berepiki, A., Lichius, A. y Read, N.D. (2011) Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**: 876-887.

Bergs, A., Ishitsuka, Y., Evangelinos, M., Nienhaus, G.U. y Takeshita, N. (2016) Dynamics of actin cables in polarized growth of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* **7**: 682.

Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J. y Steinberg, G. (2014) Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**: 5097.

Bochicchio, B. y Tamburro, A.M. (2002) Polyproline II structure in proteins: identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions. *Chirality* **14**: 782-792.

Bowman, S.M. y Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**: 799-808.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **72**: 248-254.

Breakspear, A., Langford, K.J., Momany, M. y Assinder, S.J. (2007) CopA:GFP localizes to putative Golgi equivalents in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 90-97.

Brodhun, F., Schneider, S., Gobel, C., Hornung, E. y Feussner, I. (2010) PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem. *Biochem J* **425**: 553-565.

Brown, N.A., dos Reis, T.F., Ries, L.N., Caldana, C., Mah, J.H., Yu, J.H. *et al.* (2015) G-protein coupled receptor-mediated nutrient sensing and developmental control in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **98**: 420-439.

- Busby, T.M., Miller, K.Y. y Miller, B.L. (1996) Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics* **143**: 155-163.
- Calvo, A.M. (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* **45**: 1053-1061.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. y Keller, N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447-59.
- 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.
- Cerqueira, G.C., Arnaud, M.B., Inglis, D.O., Skrzypek, M.S., Binkley, G., Simison, M. *et al.* (2014) The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* **42**: D705-D710.
- Champe, S.P. y el-Zayat, A.A. (1989) Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **171**: 3982-3988.
- Champe, S.P., Rao, P. y Chang, A. (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **133**: 1383-1387.
- Chen, Z., Luo, X., Lu, Y., Zhu, T., Wang, J., Tsun, A. y Li, B. (2013) Ubiquitination signals critical to regulatory T cell development and function. *Int Immunopharmacol* **16**: 348-352.
- Chu, X.L., Feng, M.G. y Ying, S.H. (2016) Qualitative ubiquitome unveils the potential significances of protein lysine ubiquitination in hyphal growth of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **62**: 191-201.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S. y Lukyanov, K.A. (2007a) Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nat Protoc* **2**: 2024-2032.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S. y Lukyanov, K.A. (2007b) Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* **42**: 553, 555, 557.
- Church, G.M. y Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1991-1995.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. y Muller, C.W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**: 221-229.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Cohen, C. y Parry, D.A. (1990) Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* **7**: 1-15.
- Conesa, A., Punt, P.J., van Luijk, N. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* **33**: 155-171.

Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A. y Ugalde, U. (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* **6**: e17505.

Couvertier, S.M., Zhou, Y. y Weerapana, E. (2014) Chemical-proteomic strategies to investigate cysteine posttranslational modifications. *Biochim Biophys Acta* **1844**: 2315-2330.

Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51-56.

D'Souza, C.A., Lee, B.N. y Adams, T.H. (2001) Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **158**: 1027-1036.

De Souza, C.P., Hashmi, S.B., Osmani, A.H. y Osmani, S.A. (2014) Application of a new dual localization-affinity purification tag reveals novel aspects of protein kinase biology in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **9**: e90911.

Delaunay, A., Isnard, A.D. y Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157-5166.

Delgado-Álvarez, D.L., Bartnicki-García, S., Seiler, S. y Mouriño-Pérez, R.R. (2014) Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. *PLoS One* **9**: e96744.

Duden, R. (2003) ER-to-Golgi transport: COPI and COPII function (Review). *Mol Membr Biol* **20**: 197-207.

Dyer, P.S. y O'Gorman, C.M. (2012) Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 165-192.

Efimov, V.P. (2003) Roles of NUDE and NUDF proteins of *Aspergillus nidulans*: insights from intracellular localization and overexpression effects. *Mol Biol Cell* **14**: 871-888.

Efimov, V.P. y Morris, N.R. (1998) A screen for dynein synthetic lethals in *Aspergillus nidulans* identifies spindle assembly checkpoint genes and other genes involved in mitosis. *Genetics* **149**: 101-116.

Egan, M.J., Tan, K. y Reck-Peterson, S.L. (2012) Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol* **197**: 971-982.

Etxebeste, O. y 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. y Ugalde, U. (2010a) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569-576.

Etxebeste, O., Herrero-García, E., Araujo-Bazán, L., Rodríguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U. y 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-García, E., Cortese, M.S., Garzia, A., Oartzabal-Arano, E., de los Ríos, 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-Iñarrairaegui, A., Garzia, A., Herrero-García, E., Ugalde, U. y 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., Ugalde, U. y Espeso, E.A. (2010b) Adaptative and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* **11**: 704-718.
- Etxebeste, O., Villarino, M., Markina-Iñarrairaegui, A., Araujo-Bazán, L. y Espeso, E.A. (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *PLoS One* **8**: e85076.
- Fernández-Martínez, J., Brown, C.V., Díez, E., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr., Peñalva, M.A. y 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.
- Fortwendel, J.R., Juvvadi, P.R., Rogg, L.E., Asfaw, Y.G., Burns, K.A., Randell, S.H. y Steinbach, W.J. (2012) Plasma membrane localization is required for RasA-mediated polarized morphogenesis and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **11**: 966-977.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S. *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Fischer, R., Espeso, E.A. y Ugalde, U. (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172-184.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Ugalde, U. y Espeso, E.A. (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314-1324.
- Geiser, D.M., Gueidan, C., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Kauff, F., Hofstetter, V. *et al.* (2006) Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia* **98**: 1053-1064.
- Glass, N.L., Rasmussen, C., Roca, M.G. y Read, N.D. (2004) Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol* **12**: 135-141.
- Glick, B.S. y Nakano, A. (2009) Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 113-132.
- Grieve, A.G. y Rabouille, C. (2011) Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Han, K.H., Seo, J.A. y Yu, J.H. (2004) Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol* **53**: 529-540.
- Harper, S. y Speicher, D.W. (2011) Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol* **681**: 259-280.

- Harris, S.D. (2001) Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 736-739.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. y Momany, M. (2005) Polarisome meets *Spitzenkörper*: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225-229.
- Herrero-García, E. (2013) Desarrollo asexual en *Aspergillus nidulans*: regulación molecular y celular de la actividad del bZIP FlbB.
- Herrero-García, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Cortese, M.S., Markina-Iñarrairaegui, 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.
- Hervás-Aguilar, A., Galindo, A. y Peñalva, M.A. (2010) Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *J Biol Chem* **285**: 18095-18102.
- Hervás-Aguilar, A. y Peñalva, M.A. (2010) Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9**: 1504-1518.
- Hickey, P.C., Jacobson, D., Read, N.D. y Glass, N.L. (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **37**: 109-119.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. y Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 682-696.
- Hodges, A.R., Bookwalter, C.S., Kremontsova, E.B. y Trybus, K.M. (2009) A nonprocessive class V myosin drives cargo processively when a kinesin- related protein is a passenger. *Curr Biol* **19**: 2121-2125.
- Hohmann-Marriott, M.F., Uchida, M., van de Meene, A.M., Garret, M., Hjelm, B.E., Kokoori, S. y Roberson, R.W. (2006) Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytol* **172**: 208-220.
- Horio, T. y Oakley, B.R. (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 918-926.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A. y Takagi, M. (1999) Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **181**: 3721-3729.
- Jansen, R.P., Niessing, D., Baumann, S. y Feldbrügge, M. (2014) mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet* **30**: 408-417.
- Jasik, J., Boggetti, B., Baluska, F., Volkmann, D., Gensch, T., Rutten, T. *et al.* (2013) PIN2 turnover in *Arabidopsis* root epidermal cells explored by the photoconvertible protein Dendra2. *PLoS One* **8**: e61403.
- Käfer, E. (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217-232.
- Kaminskyj, S.G. y Hamer, J.E. (1998) *hyp* loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **148**: 669-680.

- Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M.K. y Dobberstein, B. (2009) Post-targeting functions of signal peptides. *Landes Bioscience*.
- Kim, H.S., Han, K.Y., Kim, K.J., Han, D.M., Jahng, K.Y. y Chae, K.S. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 72-80.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G.J., Wang, F., Muller, W.H., Dijksterhuis, J. y Wosten, H.A. (2013) Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol* **74**: 1-29.
- Kües, U. y Fischer, R. (2006) *The Mycota: Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 1-449. Berlín: Springer.
- Kuo, A., Riley, R., Clum, A., Salamov, A., Baker, S., Simmons, B. *et al.* (2015) Whole-Genus Sequencing: 300 *Aspergilli*. The Twelfth International *Aspergillus* Meeting - Asperfest 12. Abstract.
- Kwon, N.J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U. y Yu, J.H. (2010) FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203-1219.
- La Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F.M. y Brunak, S. (2003) NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* **31**: 393-396.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lafon, A., Seo, J.A., Han, K.H., Yu, J.H. y D'Enfert, C. (2005) The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 71-80.
- Law, D.J. y Timberlake, W.E. (1980) Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **144**: 509-517.
- Lee, B.N. y Adams, T.H. (1994) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**: 641-651.
- Lee, B.N. y 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. y 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. y Yu, J.H. (2016) Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep* **6**: 28874.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A. y Steinberg, G. (2006) A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**: 2275-2286.
- Liu, H.L., Osmani, A.H., Ukil, L., Son, S., Markossian, S., Shen, K.F. *et al.* (2010) Single-step affinity purification for fungal proteomics. *Eukaryot Cell* **9**: 831-833.

- Markina-Iñarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E.A. y Peñalva, M.A. (2013) The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS One* **8**: e67154.
- Marshall, M.A. y Timberlake, W.E. (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**: 55-62.
- Martzoukou, O., Amillis, S., Zervakou, A., Christoforidis, S. y Diallinas, G. (2017) The AP-2 complex has a specialized clathrin-independent role in apical endocytosis and polar growth in fungi. *Elife* **6**.
- Mendoza-Martínez, A.E., Lara-Rojas, F., Sánchez, O. y Aguirre, J. (2017) NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* **8**.
- Minorov, A.A. y Pavelka, M. (2008) The Golgi apparatus. State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery. New York: Springer.
- Mizuno, M., Tono-zuka, T., Suzuki, S., Uotsu-Tomita, R., Kamitori, S., Nishikawa, A. y Sakano, Y. (2004) Structural insights into substrate specificity and function of glucodextranase. *J Biol Chem* **279**: 10575-10583.
- Momany, M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 580-585.
- Morris, N.R., James, S.W. y O'Connell, M.J. (1992) Mitotic regulation in *Aspergillus nidulans*. *Ciba Found Symp* **170**: 115-123.
- Murray, C.I. y Van Eyk, J.E. (2012) Chasing cysteine oxidative modifications: proteomic tools for characterizing cysteine redox status. *Circ Cardiovasc Genet* **5**: 591.
- 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.
- Ni, M., Gao, N., Kwon, N.J., Shin, K.S. y Yu, J.H. (2010) Regulation of *Aspergillus* conidiation. In Cellular and molecular biology of filamentous fungi., pp. 559-576.
- Ni, M. y Yu, J.H. (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**: e970.
- Nickel, W. y Rabouille, C. (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 148-155.
- Nickel, W. y Seedorf, M. (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 287-308.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Noventa-Jordão, M.A., do Nascimento, A.M., Goldman, M.H., Terenzi, H.F. y Goldman, G.H. (2000) Molecular characterization of ubiquitin genes from *Aspergillus nidulans*: mRNA expression on different stress and growth conditions. *Biochim Biophys Acta* **1490**: 237-244.

- O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S. y Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**: 539-544.
- Oiartzabal-Arano, E. (2016) Dinámica celular y control de la expresión génica del regulador de la conidiación de *Aspergillus nidulans* FlbB.
- Oiartzabal-Arano, E., Garzia, A., Gorostidi, A., Ugalde, U., Espeso, E.A. y 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. y Etxebeste, O. (2016) Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **62**: 371-377.
- Onischenko, E., Stanton, L.H., Madrid, A.S., Kieselbach, T. y Weis, K. (2009) Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J Cell Biol* **185**: 475-491.
- Pace, N.J. y Weerapana, E. (2013) Diverse functional roles of reactive cysteines. *ACS Chem Biol* **8**: 283-296.
- Pantazopoulou, A. (2016) The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi. *Mycologia* **108**: 603-622.
- Pantazopoulou, A. y Peñalva, 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. y Peñalva, M.A. (2014) Maturation of late Golgi cisternae into RabE(RAB11) exocytic post-Golgi carriers visualized *in vivo*. *Mol Biol Cell* **25**: 2428-2443.
- Pearson, C.G. y Bloom, K. (2004) Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 481-492.
- Peñalva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963-975.
- Peñalva, M.A. (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**: 684-692.
- Peñalva, M.A. (2015) A lipid-managing program maintains a stout *Spitzenkörper*. *Mol Microbiol* **97**: 1-6.
- Peñalva, M.A., Zhang, J., Xiang, X. y Pantazopoulou, A. (2017) Transport of fungal RAB11 secretory vesicles involves myosin-5, dynein/dynactin/p25 and kinesin-1 and is independent of kinesin-3. *Mol Biol Cell*.
- Pereira de Souza, C.C., Prado, G.M., da Conceição Freitas, R.C., Santos Guimãres, P.S., de Oliveira, L.C., Eustáquio, A.B.-M. y de Figueiredo Conte Vanzela A.P. (2011) Analysis of *Aspergillus nidulans* germination, initial growth and carbon source response by flow cytometry. *J Basic Microbiol* **51**: 459-466.

- Perez-de-Nanclares-Arregi, E. y Etxebeste, O. (2014) Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **70**: 33-41.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne G. y Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**: 785-786.
- Pinar, M., Arst, H.N. Jr., Pantazopoulou, A., Tagua, V.G., de los Ríos, V., Rodríguez-Salarichs, J. *et al.* (2015) TRAPPII regulates exocytic Golgi exit by mediating nucleotide exchange on the Ypt31 ortholog RabE^{RAB11}. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 4346-4351.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst, H.N. Jr. y Peñalva, M.A. (2013a) Acute inactivation of the *Aspergillus nidulans* Golgi membrane fusion machinery: correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization. *Mol Microbiol* **89**: 228-248.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A. y Peñalva, M.A. (2013b) Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement. *Autophagy* **9**: 1024-1043.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D. y Bufton, A.W.J. (1953) The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* **5**: 141-238.
- Popchock, A.R., Tseng, K.F., Wang, P., Karplus, P.A., Xiang, X. y Qiu, W. (2017) The mitotic kinesin-14 KlpA contains a context-dependent directionality switch. *Nat Commun* **8**: 13999.
- Prade, R.A. y 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.
- Ramírez, J., Min, M., Barrio, R., Lindon, C. y Mayor, U. (2016) Isolation of ubiquitinated proteins to high purity from *in vivo* samples. *Methods Mol Biol* **1449**: 193-202.
- Read, N.D. y Kalkman, E.R. (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* **39**: 199-203.
- Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P. *et al.* (2001) Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42**: 121-132.
- Riquelme, M. (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**: 587-609.
- Riquelme, M., Fischer, R. y Bartnicki-García, S. (2003) Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasts* **222**: 211-215.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S. y Fischer, R. (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**: 585-610.
- Rodríguez-Urra, A.B., Jiménez, C., Nieto, M.I., Rodríguez, J., Hayashi, H. y Ugalde, U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* **7**: 599-606.

- Rossi, A.M. y Taylor, C.W. (2011) Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nat Protoc* **6**: 365-387.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Capellaro, J.L., Kitamoto, K., da Silva Ferreira, M.E. *et al.* (2008) Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol Microbiol* **70**: 44-59.
- Schalén, M., Anyaogu, D.C., Hoof, J.B. y Workman, M. (2016) Effect of secretory pathway gene overexpression on secretion of a fluorescent reporter protein in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology and Biotechnology* **3**.
- Schnell, J.D. y Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**: 35857-35860.
- Schoch, C.L., Aist, J.R., Yoder, O.C. y Gillian, T.B. (2003) A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* **39**: 1-15.
- Scholz, D., Fortsch, J., Bockler, S., Klecker, T. y Westermann, B. (2013) Analyzing membrane dynamics with live cell fluorescence microscopy with a focus on yeast mitochondria. *Methods Mol Biol* **1033**: 275-283.
- Schultzhaus, Z., Quintanilla, L., Hilton, A. y Shaw, B.D. (2016) Live cell imaging of actin dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microsc Microanal* **22**: 264-274.
- Schultzhaus, Z. y Shaw, B. (2015) Endocytosis and exocytosis in hyphal growth. *Fungal Biology Reviews*: 1-11.
- Schuster, M., Martin-Urdiroz, M., Higuchi, Y., Hacker, C., Kilaru, S., Gurr, S.J. y Steinberg, G. (2016) Co-delivery of cell-wall-forming enzymes in the same vesicle for coordinated fungal cell wall formation. *Nat Microbiol* **1**: 16149.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N.J. y Steinberg, G. (2012) Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J* **31**: 214-227.
- Schutze, K., Harter, K. y Chaban, C. (2008) Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Sci* **13**: 247-255.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E. *et al.* (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* **139**: 1137-1155.
- Seo, J.A., Guan, Y. y Yu, J.H. (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544.
- Seo, J.A., Han, K.H. y Yu, J.H. (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 81-89.
- Sewall, T.C., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990a) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**: 731-739.

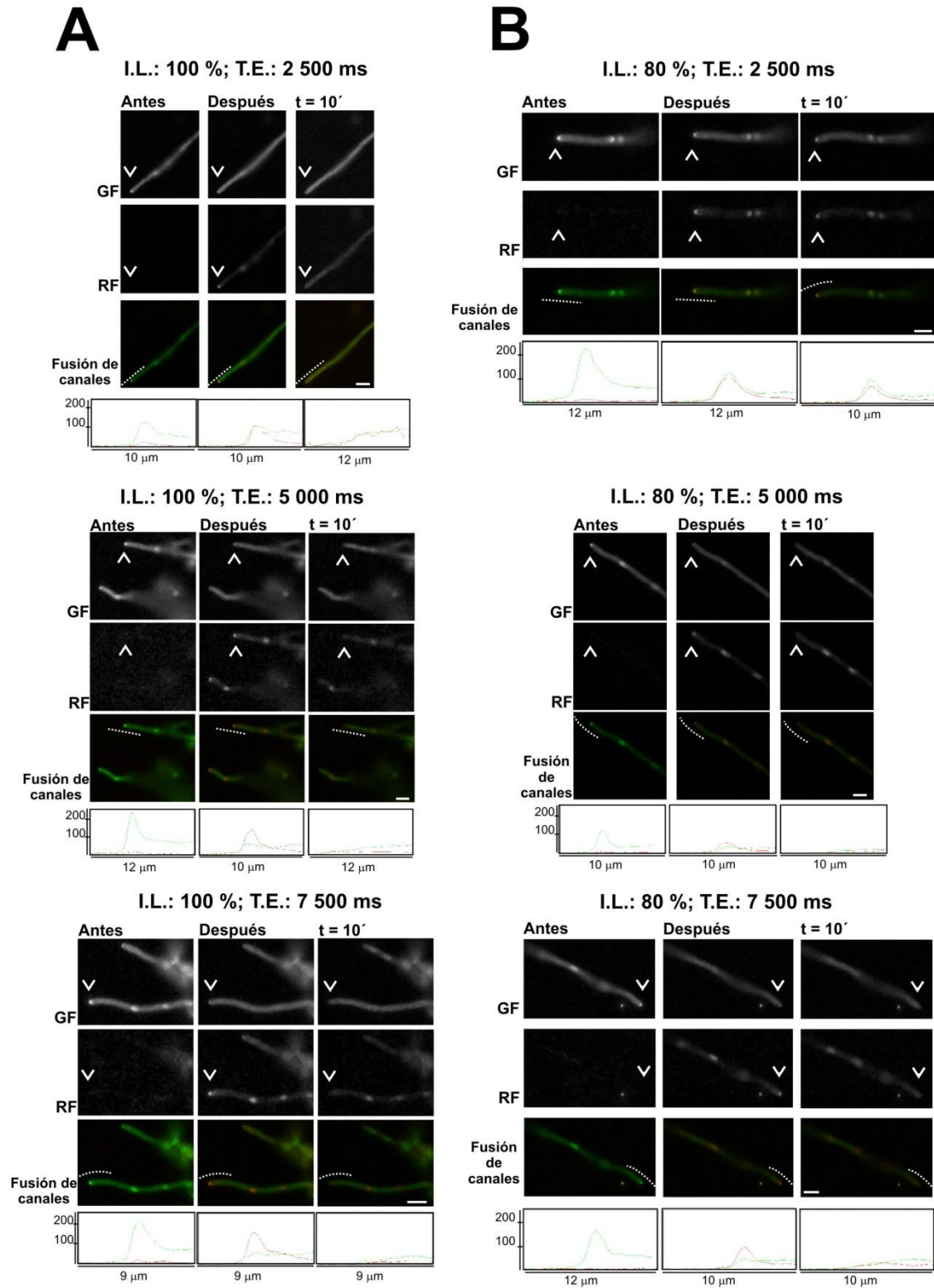
- Sewall, T.C., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990b) Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev Biol* **138**: 499-508.
- Shannon, D.A. y Weerapana, E. (2014) Orphan PTMs: Rare, yet functionally important modifications of cysteine. *Biopolymers* **101**: 156-164.
- Shukla, N., Osmani, A.H. y Osmani, S.A. (2017) Microtubules are reversibly depolymerized in response to changing gaseous microenvironments within *Aspergillus nidulans* biofilms. *Mol Biol Cell*.
- Slaughter, B.D., Smith, S.E. y Li, R. (2009) Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a003384.
- Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K.T., Vallee, R.B., Holzbaur, E.L., Weiss, D.G. y Kuznetsov, S.A. (1997) The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus oocytes*. *Mol Biol Cell* **8**: 2077-2088.
- Steinberg, G. (2007) Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol* **174**: 721-733.
- Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazán, L. y Calvo, A.M. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**: 242-255.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N. *et al.* (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**: 3111-3120.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Peñalva, M.A. *et al.* (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 1439-1449.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. y Oakley, B.R. (2012) The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e31218.
- Takeshita, N., Manck, R., Grun, N., de Vega, S.H. y Fischer, R. (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**: 34-41.
- Takeshita, N., Ohta, A. y Horiuchi, H. (2005) CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 1961-1970.
- Takeshita, N., Wernet, V., Tsuzaki, M., Grun, N., Hoshi, H.O., Ohta, A. *et al.* (2015) Transportation of *Aspergillus nidulans* class III and V chitin synthases to the hyphal tips depends on conventional kinesin. *PLoS One* **10**: e0125937.
- Taylor, J., Bowman, B., Berbee, M.L. y White, T.J. (1993) Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. *Systematic Biology* **42**: 440-457.
- Thompson, B.J. (2013) Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies. *Development* **140**: 13-21.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C. y Taylor, G.G. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.

- Todd, R.B., Davis, M.A. y Hynes, M.J. (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2**: 822-830.
- Tom, C.T. y Martin, B.R. (2013) Fat chance! Getting a grip on a slippery modification. *ACS Chem Biol* **8**: 46-57.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. y 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. y Keller, N.P. (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**: 1809-1821.
- Upadhyay, S. y 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. y Taparowsky, E.J. (2006) Deciphering B-ZIP transcription factor interactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 4-12.
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R. y Bonovich, M. (2002) Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* **22**: 6321-6335.
- Vinson, C.R., Hai, T. y Boyd, S.M. (1993) Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev* **7**: 1047-1058.
- Virag, A. y Harris, S.D. (2006) The *Spitzenkörper*: a molecular perspective. *Mycol Res* **110**: 4-13.
- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Jones, N., Ayte, J. e Hidalgo, E. (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* **52**: 1427-1435.
- Vorvis, C., Markus, S.M. y Lee, W.L. (2008) Photoactivatable GFP tagging cassettes for protein-tracking studies in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**: 651-659.
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L. y Resh, M.D. (2000) Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **275**: 261-270.
- Wieser, J. y 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, y Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62-69.
- Winey, M. y O'Toole, E.T. (2001) The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol* **3**: E23-E27.
- Wu, X., Xiang, X. y Hammer, J.A. III (2006) Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol* **16**: 135-143.
- Xiang, X., Beckwith, S.M. y Morris, N.R. (1994) Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2100-2104.

- Yager, L.N. (1992) Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **23**: 19-41.
- Yamada, M., Tanaka-Takiguchi, Y., Hayashi, M., Nishina, M. y Goshima, G. (2017) Multiple kinesin-14 family members drive microtubule minus-end-directed transport in plant cells. *Cold Spring Harbor*.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C. *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **3**: 1359-1362.
- Young, A., Dichtenberg, J.B., Purohit, A., Tuft, R. y Doxsey, S.J. (2000) Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell* **11**: 2047-2056.
- Yu, J.H. (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **44**: 145-154.
- Yu, J.H. (2010) Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* **38**: 229-237.
- Yu, J.H., Mah, J.H. y Seo, J.A. (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryot Cell* **5**: 1577-1584.
- Zarnack, K. y Feldbrügge, M. (2010) Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. *Eukaryot Cell* **9**: 982-990.
- Zhang, F.L. y Casey, P.J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269.
- Zhang, J., Li, S., Fischer, R. y Xiang, X. (2003) Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* **14**: 1479-1488.
- Zhang, J., Qiu, R., Arst, H.N. Jr., Peñalva, M.A. y Xiang, X. (2014) HookA is a novel dynein-early endosome linker critical for cargo movement *in vivo*. *J Cell Biol* **204**: 1009-1026.
- Zhang, J., Zhuang, L., Lee, Y., Abenza, J.F., Peñalva, M.A. y Xiang, X. (2010) The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci* **123**: 3596-3604.
- Zheng, H., Kim, J., Liew, M., Yan, J.K., Herrera, O., Bok, J.W. *et al.* (2015) Redox metabolites signal polymicrobial biofilm development via the NapA oxidative stress cascade in *Aspergillus*. *Curr Biol* **25**: 29-37.

CAPÍTULO 7: Anexos

ANEXO 1. Localización subcelular de FhbB::Dendra2, expresado a través de *gpdA^{mini}*, antes y después de la fotoconversión



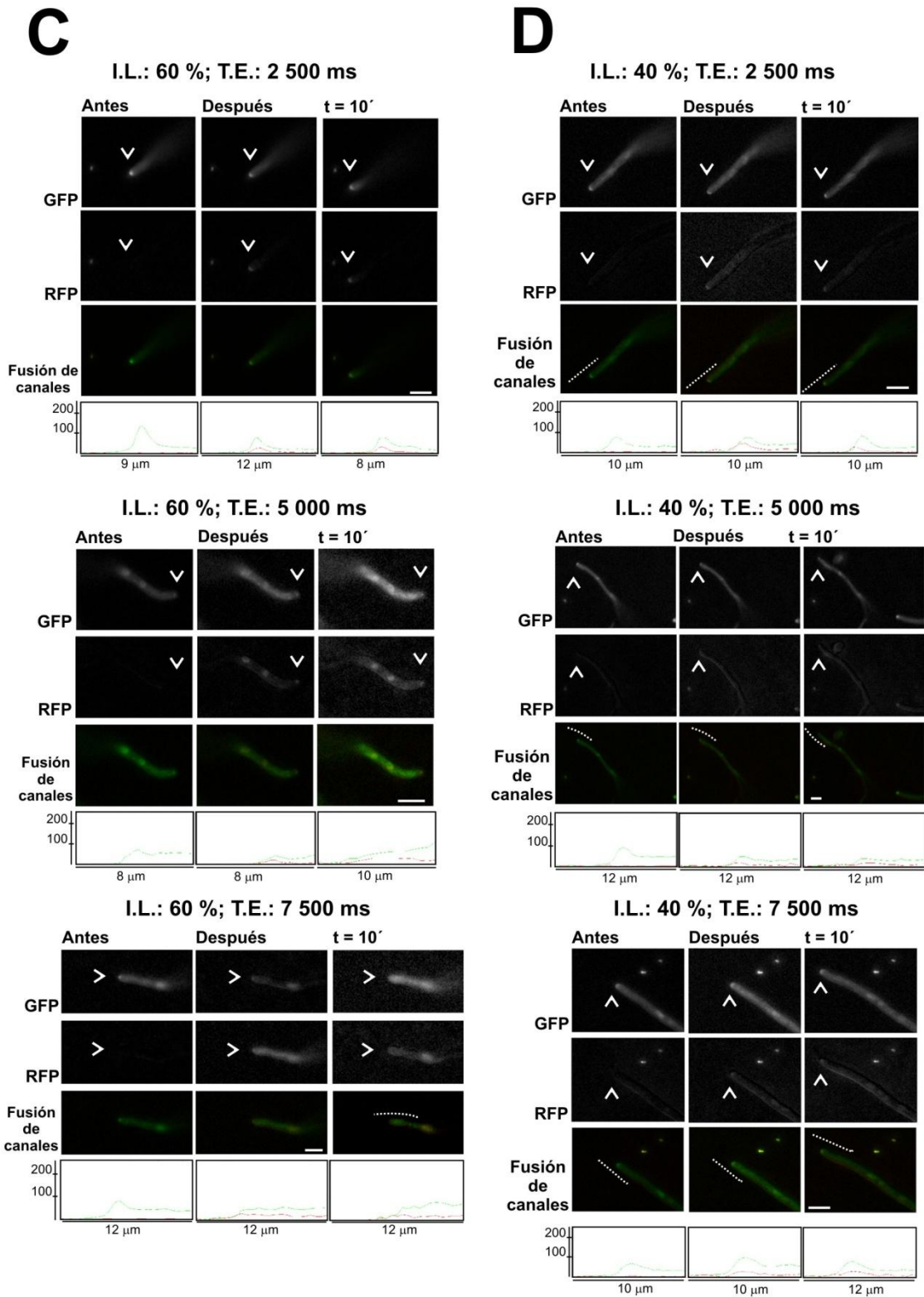


Figura 7.1: Análisis del efecto de la intensidad de la radiación UV y el tiempo de exposición en la fotoconversión de Dendra2. Se realizaron las medidas tomando como referencia la punta de las hifas vegetativas. Representación de la fluorescencia verde y roja de *gpdA^{mini}::FibB::Dendra2* antes y después (0 y 10 minutos) de inducir la fotoconversión para cada intensidad de lámpara (I.L.; A: 100 %, B: 80 %, C: 60 % y D: 40 %) y el tiempo de exposición (T.E.; columnas, 1: 2 500 ms, 2: 5 000 ms, 3: 7 500 ms). Las flechas blancas indican las puntas de las hifas analizadas en los gráficos, los cuales muestran la intensidad de las fluorescencias verde y roja a lo largo de las líneas discontinuas. Barra de escala en todos los paneles: 5 μm. Ver también la tabla 3.1.

ANEXO 2. Solubilidad de las quimeras GST::FlbB expresadas en *E. coli*

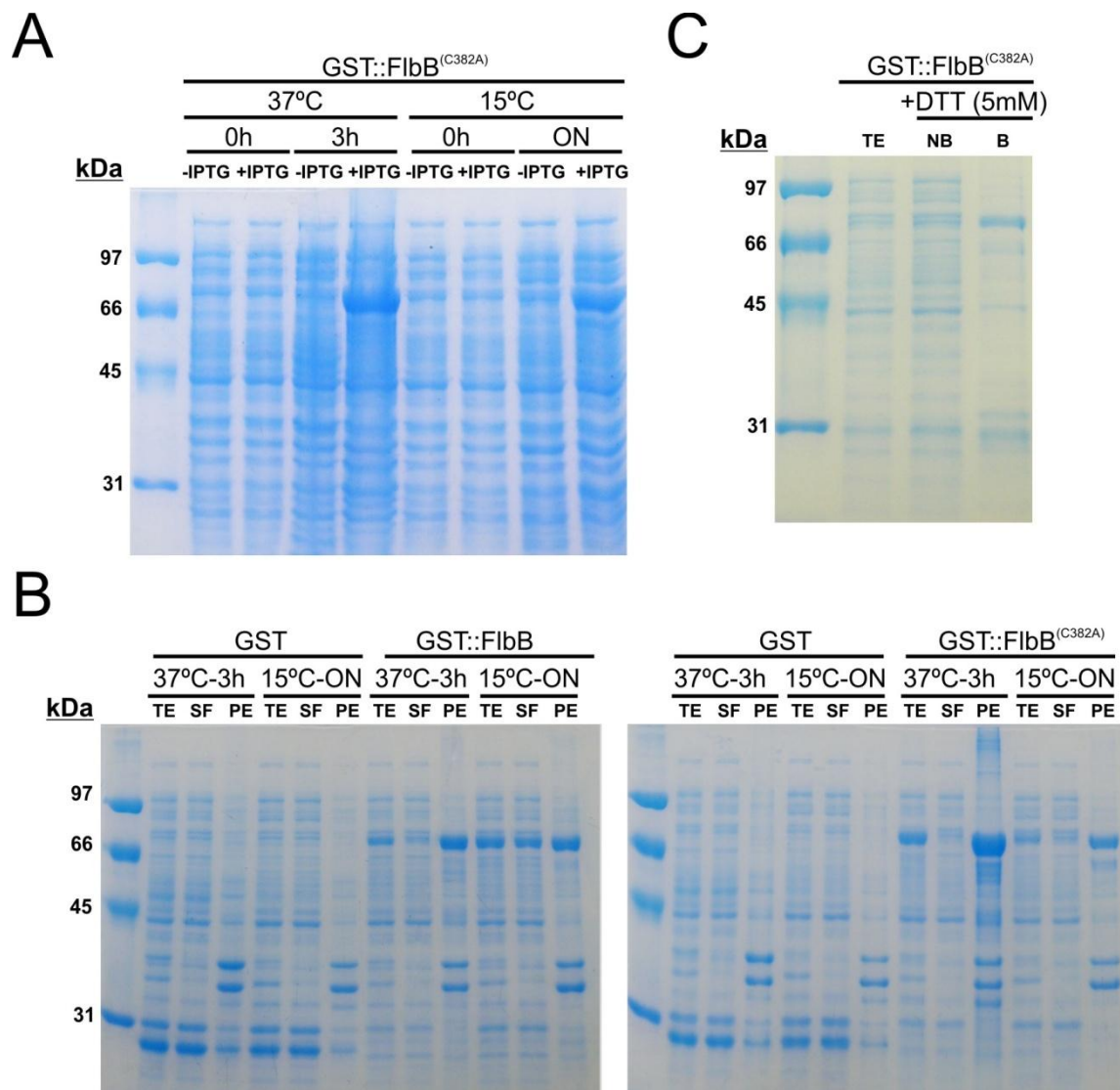


Figura 7.2: Solubilidad de las quimeras GST::FlbB provenientes de extractos de *E. coli*. **A)** Gel de SDS-PAGE teñido con *Coomassie* que muestra la expresión de la quimera GST::FlbB^(C382A) en células de *E. coli*. La expresión se indujo con la adición de 0.1 mM de IPTG al medio y se incubaron las muestras a 37 °C durante 3 horas o a 15 °C durante toda la noche. **B)** Gel de SDS-PAGE que muestra la solubilidad de GST::FlbB^(C382A) comparado con las quimeras GST o GST::FlbB. **C)** Unión de la quimera GST::FlbB^(C382A) a la resina glutatión sefarosa bajo condiciones que supuestamente favorecen la resuspensión de los cuerpos de inclusión (5 mM DTT).

ANEXO 3. Artículo científico

Fungal Genetics and Biology 70 (2014) 33–41



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

Tools and Techniques

Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi



Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi, Oier Etxebeste*

Biochemistry II Laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country, 20018 San Sebastian, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2014
 Accepted 17 June 2014
 Available online 9 July 2014

Keywords:

Filamentous fungi
 Growth
 Asexual development
 Protein dynamics
 Photo-convertible tagging
 Dendra2

ABSTRACT

Photo-convertible fluorescent proteins (PCFPs) undergo a dramatic change in their excitation and emission spectra upon irradiation at specific wavelengths, thus rendering a different color. Dendra2 is a commercially available PCFP used to track the redistribution of proteins within cellular compartments, their life-time or interactions. Before photo-conversion Dendra2 exhibits green fluorescence, which becomes red after irradiation with either UV or blue lights. Multiple studies including Dendra2 as a molecular tool have been described in eukaryotes but not in filamentous fungi. Here we present a method to tag low-expression proteins from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* with Dendra2 and track their cellular dynamics. The regulator of asexual development FlbB was selected as control, a transcription factor that is expressed at low levels and can be used as a marker for the tip and nuclei of vegetative hyphae. This control provided us with a visual way to confirm the functionality of our genomic and plasmid constructs, since a non-functional FlbB protein renders a block in development and a characteristic aconidial phenotype. Our protocol combines standardized cloning and transformation procedures with the use of a mercury lamp microscope to convert and follow Dendra2 within cells. Hence, we present a rapid, simple and inexpensive method that makes tracking analysis of proteins that present technical difficulties to be followed feasible in filamentous fungi.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The use of photo-switchable (PSFP; switch between fluorescent and dark states), photo-activatable (PAFP; fluorescence intensity increases upon irradiation) and photo-convertible (PCFP; change from one emission wavelength to another) fluorescent proteins (FP) gives unique opportunities to photo-label and track fusion proteins in a living cell (Chudakov et al., 2007a). Dendra2 is a green-to-red monomeric PCFP that has become a valuable tool due to the following benefits (Fig. 1): (1) the tagged protein can be tracked in green before photo-conversion (excitation and emission at 490 and 507 nm, respectively); (2) Dendra2 can be photo-activated using either UV (405 nm) or blue (488 nm) activating lights, and (3) the activated red Dendra2 signal renders high photostability, with excitation and emission at 553 and 573 nm, respectively (Chudakov et al., 2007b). The commercial availability of Dendra2 and its beneficial features have improved its use in several studies, which were mostly conducted in higher eukaryotes and also in yeast (Chudakov et al., 2007b; Jasik et al., 2013; Onischenko et al., 2009; Scholz et al., 2013).

In this work, we describe a simple method to tag with Dendra2 proteins from the filamentous fungus *A. nidulans* and track them within vegetative cells. These cells are non-specialized, syncytial (multinucleated) structures characterized by a continuous elongation of the tip, which occurs through the addition of new materials that are transported from distal regions (Penalva et al., 2012; Riquelme, 2013). The protocol by Pantazopoulou and Peñalva (2009) was elaborated to drive the expression of the tagged protein through the constitutive *gpdA^{mini}* promoter. To validate our method, we focused on the tip of vegetative hyphae, which includes key factors for the signaling of development, such as the transcription factor FlbB (Etxebeste et al., 2008). The use of FlbB as control provided us, on one hand, with a visual screen method to determine the functionality of our constructs since mutations in *flbB* or misscheduled expression and localization of the protein lead to a characteristic aconidial growth pattern known as the *fluffy* phenotype (Etxebeste et al., 2008; Wieser et al., 1994). On the other hand, the analysis of FlbB localization and dynamics through Dendra2 labeling confirmed the same behavior as described in previous works (Etxebeste et al., 2008, 2009; Garzia et al., 2009). Since *flbB* expression in vegetative cells is low (Garzia et al., 2010), photo-conversion of Dendra2 was not induced using confocal microscopy and laser irradiation of a region of interest (ROI). In this

* Corresponding author. Fax: +34 943015270.
 E-mail address: oier.echeveste@ehu.es (O. Etxebeste).

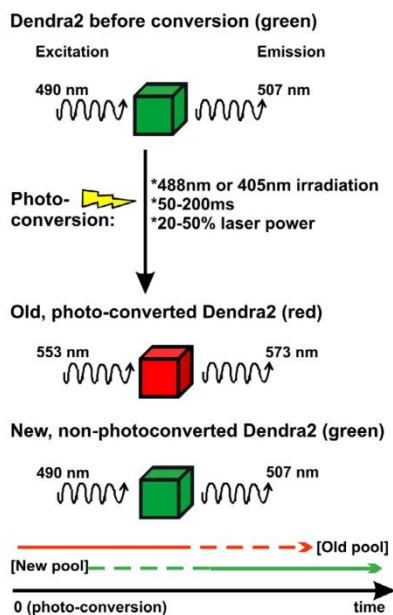


Fig. 1. Background of the Dendra2 photo-convertible tag. Before irradiation, the localization of the Dendra2-tagged protein can be analyzed following green fluorescence. Then, the entire cell or a ROI (region of interest) of the cell is irradiated with 405 nm or 488 nm laser light (50–200 ms; 20–50% of the laser power; optimal conditions have to be set for each system). Immediately, green Dendra2 is photo-converted to the red form. Dynamics of the old protein pool as well as its half-life may be followed in red. New protein fluoresces in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

work, the entire field of view was photo-activated using standard mercury arc illumination and an UV (DAPI; excitation at 355 nm) filter, as described previously by Vorvis et al. (2008). Photo-conversion of specific regions within vegetative hyphae was also achieved by locating them in the center of the visible field and closing the diaphragm to pinhole size (Baker et al., 2010). Then, red (old, photo-converted pool) and green (new pool) fluorescence of FlbB::Dendra2 were followed with time. Overall, this strategy opens an avenue for an easy, standardized and economical way to study protein localization and dynamics in filamentous fungi through PCFPs.

2. Materials and methods

2.1. Tools: plasmids and strains

Dendra2 sequence was obtained from Clontech as plasmid pDendra2 (<http://www.clontech.com>). According to the company's website, the brightness of Dendra2 was significantly lower compared to that of E-GFP (http://www.clontech.com/OA_MEDIA/xxclt_media/MainWP063553.html). In addition, we have previously described that the detection of FlbB::GFP or GFP::FlbB chimeras in vegetative hyphae required long exposure times (~1000 ms; Etxebeste et al., 2009). Taking these constraints into consideration, the use of a low expression protein as FlbB as control to analyze the viability of our Dendra2 labeling protocol might require the use of a strain expressing higher amounts of FlbB. Consequently, we generated *A. nidulans* strains in which FlbB::Dendra2

expression was driven either by the native *flbB* promoter, *flbB^P*, or the constitutive, attenuated (mini) version of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter, *gpdA^{mini}* (Pantazopoulou and Peñalva, 2009). We then analyzed which strain rendered reasonable fluorescence levels (see Section 3.1).

To obtain a strain expressing FlbB::Dendra2 driven by the native promoter, pGEM::*5xGA::dendra2::pyrG^{Δlum}* plasmid, p146 at our database, was generated according to the procedure detailed in Supplementary Fig. 1A (see oligonucleotides used in Supplementary Table 1). This plasmid allows the use of the same oligonucleotides that may be used for GFP-labeling (pFN03 as template) based on the fusion-PCR technique described by Yang et al. (2004) (Supplementary Fig. 1A). The fusion-PCR *flbB::dendra2::pyrG^{Δlum}* cassette was used to transform protoplasts of strain TN02A3 (Nayak et al., 2006). Homologous recombination at the native *locus* was confirmed by Southern-blot (*EcoRV* digestion; *flbB-GSP3/GSP4* probe; not shown), as a 5.1 Kb band was detected in the genomic DNA of the transformants compared to the 2.4 Kb band of the parental wild-type strain. Strain BD608 (*flbB::dendra2::pyrG^{Δlum}*) was stored.

To obtain a strain expressing FlbB::Dendra2 driven by the *gpdA^{mini}* promoter (Pantazopoulou and Peñalva, 2009), plasmid p*gpdA^{mini}::flbB::dendra2::pyrA*, p154 at our database, was generated (see the detailed procedure in Supplementary Fig. 1B) and used to transform protoplasts of a Δ *flbB* strain (Garzia et al., 2010). Recombination at the *pyrA* locus was confirmed by Southern-blot (*BamHI* digestion, *pyrA* probe; not shown), since two bands of 10.5 and 2.0 Kb (integration of one copy of the plasmid; two or more copies generated a third band of 5.5 Kb), respectively, were detected in the transformants compared to the unique 5.8 Kb band of the parental strain. Strain BD660, which bore one copy of the plasmid, was stored at our database.

2.2. Functionality of constructs

With the aim of confirming the functionality of our constructs, we first analyzed conidia production per unit area for each strain generated and the corresponding control or parental strains. It was expected that the appropriate recombination of the constructs, which bore no mutation within *flbB* or *dendra2* sequences, had to render a conidiation phenotype with a similar conidia production compared to control wild type strains. A significantly lower conidia production would be indicative of a loss of function of FlbB. Fig. 2 confirms a non-significant variation in conidia/cm² production when *flbB^P::flbB::dendra2* and its parental wild type, or *gpdA^{mini}::flbB::dendra2* and *gpdA^{mini}::gfp::flbB* were compared (three replicates for each strain; $p > 0.01$ in both comparisons; non-significant change). Thus, we concluded that all strains contained functional FlbB sequences.

2.3. Techniques: fluorescence microscopy

Cellular localization of GFP- or Dendra2-tagged FlbB in vegetative hyphae was analyzed by culturing for 16 h conidiospore suspensions in 8-well plates (Ibidi, Germani; Cat. No. 80821) containing 300 μ l/well of adequately supplemented Watch Minimal Medium (WMM; Penalva, 2005). Fluorescence images were obtained from these *in vivo* cultures at 37 °C using one of the following microscopes: (1) a DMI 6000B Leica inverted microscope, equipped with a 63 \times Plan Apo 1.4 N.A. oil immersion lens (Leica), and fitted with GFP (excitation 470 nm; emission 525 nm), Txred (excitation 562 nm; emission 624 nm) and D (UV; excitation 355 nm; emission 470 nm) filters, for GFP and Cherry-Red, or induce photo-conversion of Dendra2, respectively and (2) an Axio Observer Z1 inverted microscope, equipped with a 63 \times Plan-Apochromat 1.4 oil immersion lens, and fitted with filters number

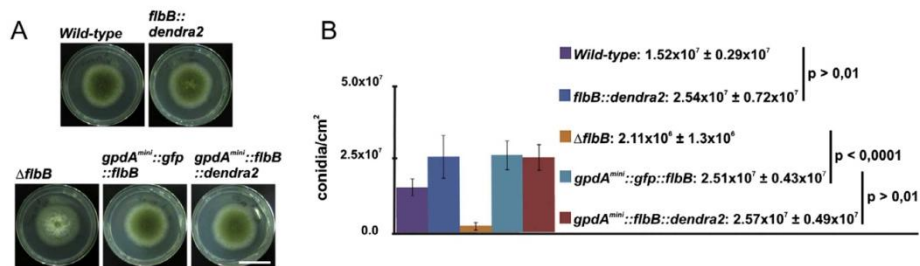


Fig. 2. Assessment of the functionality of constructs. (A) Phenotypes of the strains generated were compared to parents TN02A3 (Nayak et al., 2006) and BD177 (Garzia et al., 2010). Scale bar = 2 cm. (B) Conidia production by each of the strains in panel A. Values are the mean of three replicates plus s.e.m. Significances in the change in conidia production are indicated ($p > 0.01$: non-significant change; $p < 0.01$: significant).

38 (green fluorescence: excitation 470 nm; emission 525 nm), 43 (red fluorescence: excitation 545 nm; emission 605 nm) and 49 (DAPI: excitation 365 nm; emission 445 nm), respectively. This microscope included a diaphragm slider for the irradiation of specific areas within hyphae. A filter wheel was used for green and red fluorescence filters instead of simultaneous image acquisition to avoid any possible crosstalk between green and red signals. 500–1000 ms exposures were used to detect green or red signals of *FlbB::Dendra2*, respectively. We always used the same conditions for image acquisition before and after photo-conversion.

Although photo-conversion of *Dendra2* may be directed to a ROI by laser bleaching at 405 nm or 488 nm (see Fig. 1), the use of confocal microscopy was avoided in this work due to the low expression levels of *flbB*. Photo-conversion was achieved simply by irradiating the entire field of view or specific areas within it with standard mercury arc illumination. We confirmed that exposures of the sample with light filtered with the UV filter (excitation at 355 nm) triggered photo conversion of *Dendra2* (see Section 3.2) while up to 10 s irradiations with light filtered with the GFP filter did not (not shown).

To assess the photo-conversion of *Dendra2* with UV irradiation intensity and time, we measured average GF and RF intensity values at the tip (obtained from at least four points) before and after. The decrease in GF and increase in RF were calculated in percentage. We determined the average GF decrease and RF increase (plus standard deviation) for four hyphae in each condition. Green and red fluorescence images were also acquired 5 and 10 min after photo-conversion to check if the UV-irradiation affected growth.

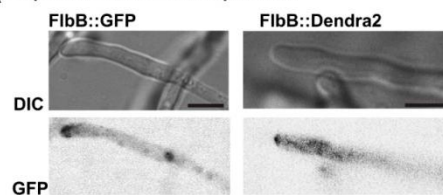
Image processing and mono- or bi-dimensional fluorescence plots were obtained with ImageJ (version 1.45s). Using the fluorescence values of monodimensional plots at different times, new graphs showing green or red fluorescence variation at the tip and/or nuclei with time were obtained using Office Excel (Microsoft). Statistical significance of differences observed in the fluorescence intensity ratios between GFP and *Dendra2* was assessed using *t*-test (two-tailed).

3. Results

3.1. *FlbB::Dendra2* shows significantly lower fluorescence intensity than the GFP counterpart

The reported lower brightness of *Dendra2* compared to EGFP, on one hand, and the low *flbB* expression in vegetative hyphae, on the other hand, made us assess the fluorescence intensity of *FlbB::Dendra2* constructs and their GFP counterparts to choose the appropriate strain for photo-conversion experiments. When expression was driven by the native *flbB* promoter, *FlbB::GFP*

A Expression under native promoter



B Expression under constitutive *gpdA^{mtl}* promoter

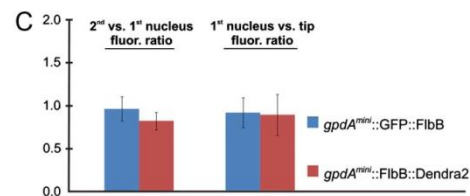
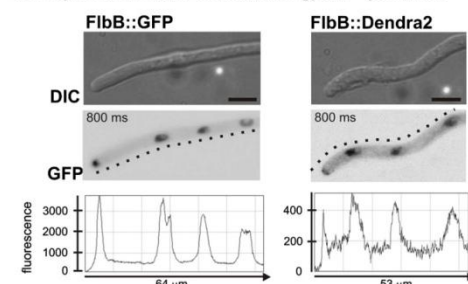


Fig. 3. Comparison between GFP and *Dendra2* green fluorescence intensities. (A) Comparison between *FlbB::GFP* (BD167; Etxebeste et al., 2008) and *FlbB::Dendra2* (BD608) strains, which express these chimeras under native *flbB* promoter. Scale bar = 5 μ m. (B) Comparison between *GFP::FlbB* (BD630) and *FlbB::Dendra2* (BD660) strains, which constitutively express these chimeras driven by the constitutive *gpdA^{mtl}* promoter. Top panels show one hyphae of each strain (scale bar = 5 μ m) while bottom panels show the fluorescence intensity plot for the lines drawn above. (C) Graphs showing the fluorescence intensity ratio between the second and the most apical (1st) nuclei, on one hand, and the 1st nucleus and the tip, on the other hand, both for *gpdA^{mtl}::GFP::FlbB* (blue) and *gpdA^{mtl}::FlbB::Dendra2* (red) strains. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was detected at the tip and the most apical nucleus (Fig. 3A, left; Etxebeste et al., 2008). However, *FlbB::Dendra2* was hardly detected at the tip and was not detected at the most apical nucleus

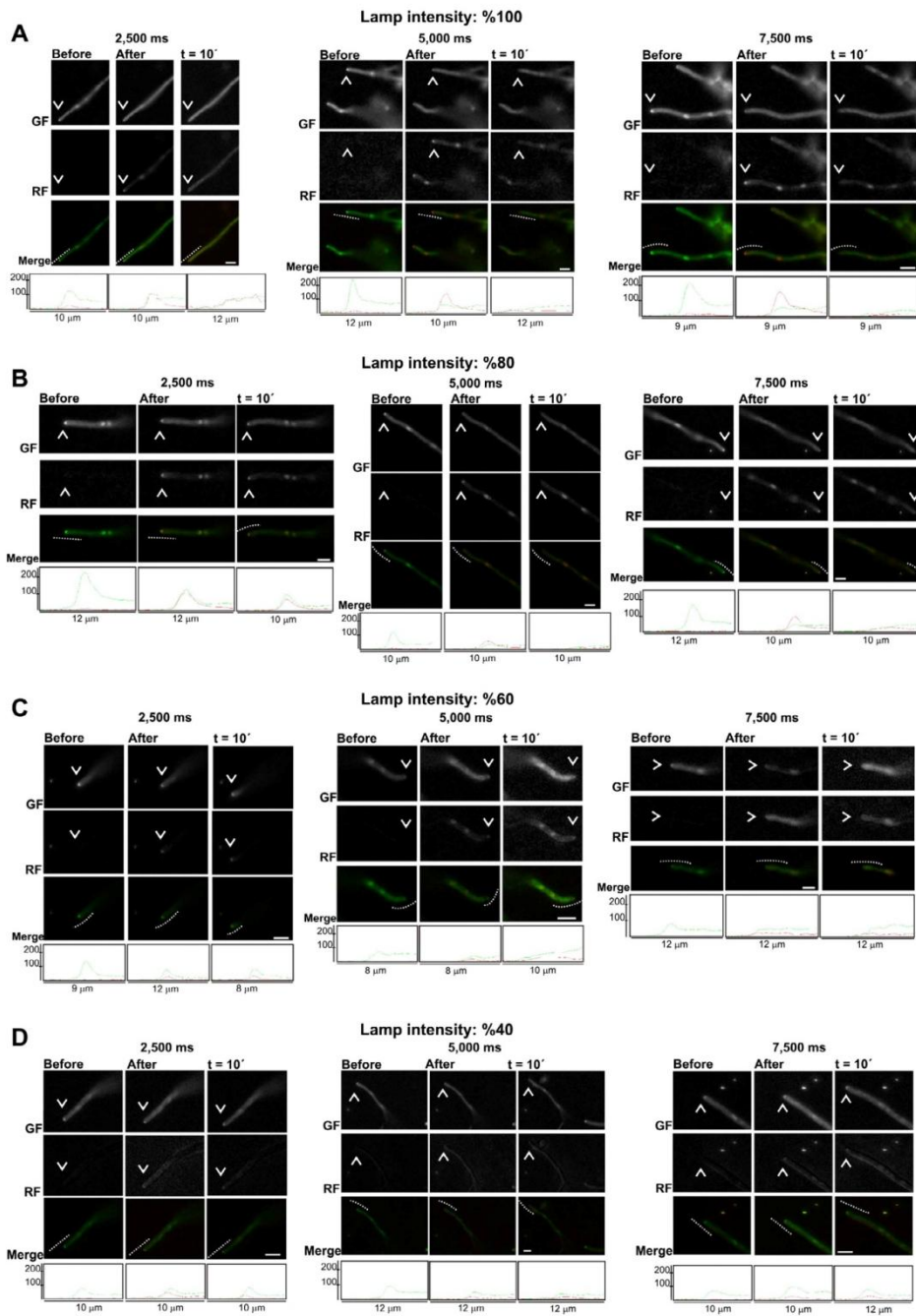


Fig. 4. Assessment of Dendra2 conversion at the tip of vegetative hyphae with UV-irradiation intensity and time. Representation of the photo-conversion efficiency of FhbB::Dendra2, defined as the percentage of the decrease in green fluorescence before and after (see Table 1), and the effect on polar extension of different lamp intensities (A: 100%; B: 80%; C: 60% and D: 40%) and photo-conversion times (columns, 1: 2500 ms; 2: 5000 ms; 3: 7500 ms). White arrowheads and dotted lines indicate the hyphal tips analyzed in fluorescence intensity graphs. Scale bar in all panels = 5 μ m. See also Table 1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Assessment of Dendra2 conversion at the tip of vegetative hyphae with UV irradiation intensity and time. Values represent the average percentages of GF decrease and RF increase, plus standard deviation, for a set of four hyphae in each condition (see Fig. 4; see also Section 2).

Exposition time (ms)	2500			5000			7500		
	Average decrease in GF (% ± SD)	Average increase in RF (% ± SD)	Growth inh.	Average decrease in GF (% ± SD)	Average increase in RF (% ± SD)	Growth inh.	Average decrease in GF (% ± SD)	Average increase in RF (% ± SD)	Growth inh.
100	45 ± 10	737 ± 398	Yes	63 ± 3	667 ± 117	Yes	67 ± 6	914 ± 374	Yes
80	52 ± 1	877 ± 111	No	62 ± 10	805 ± 216	Yes	58 ± 9	1298 ± 158	Yes
60	40 ± 15	433 ± 301	No	33 ± 11	360 ± 47	Yes	54 ± 3	463 ± 277	Yes
40	27 ± 20	161 ± 60	No	31 ± 7	209 ± 21	No	22 ± 10	289 ± 154	No

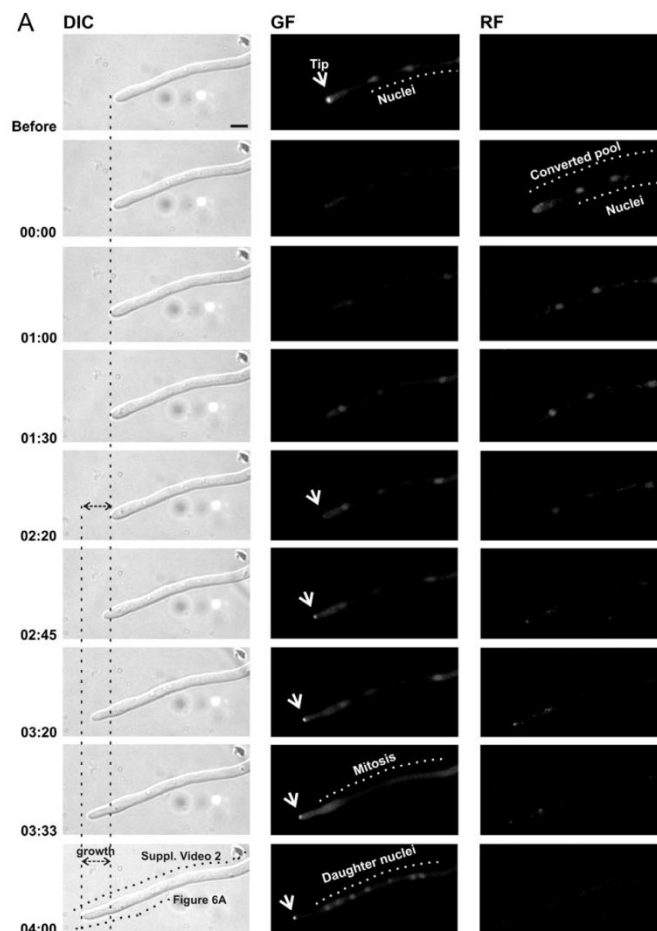


Fig. 5. Tracking of FlbB::Dendra2. (A) DIC as well as green (GF) and red (RF) fluorescence images before and after irradiation of an *A. nidulans* hypha expressing FlbB::Dendra2 driven by the *gpdA^{mini}* constitutive promoter. Photo-conversion was achieved after irradiation of the entire field of view with UV-light (80% of the maximum intensity) during 8000 ms. Frames were extracted from [Supplementary Video 1](#). Time after photo-conversion is indicated in hours:minutes. Dotted lines in the last DIC image indicate the hyphal regions shown in [Supplementary Video 2](#) or [Fig. 6](#). Scale bar = 5 μ m.

([Fig. 3A](#), right). Consequently, we discarded strain BD608 for photo-conversion analyses.

When FlbB::Dendra2 was driven by the constitutive *gpdA^{mini}* promoter, the chimera followed the same subcellular distribution (green channel) as that one described in a *gpdA^{mini}::GFP::FlbB*

strain ([Fig. 3B](#)), being detected at the tip and all nuclei within the syncytium. Fluorescence intensity values were an average of 8.4 ± 0.9 times lower when tagging FlbB with Dendra2 compared to the GFP-tagged strain (the average and the s.e.m were obtained considering fluorescence intensity ratios at the tip and first, second

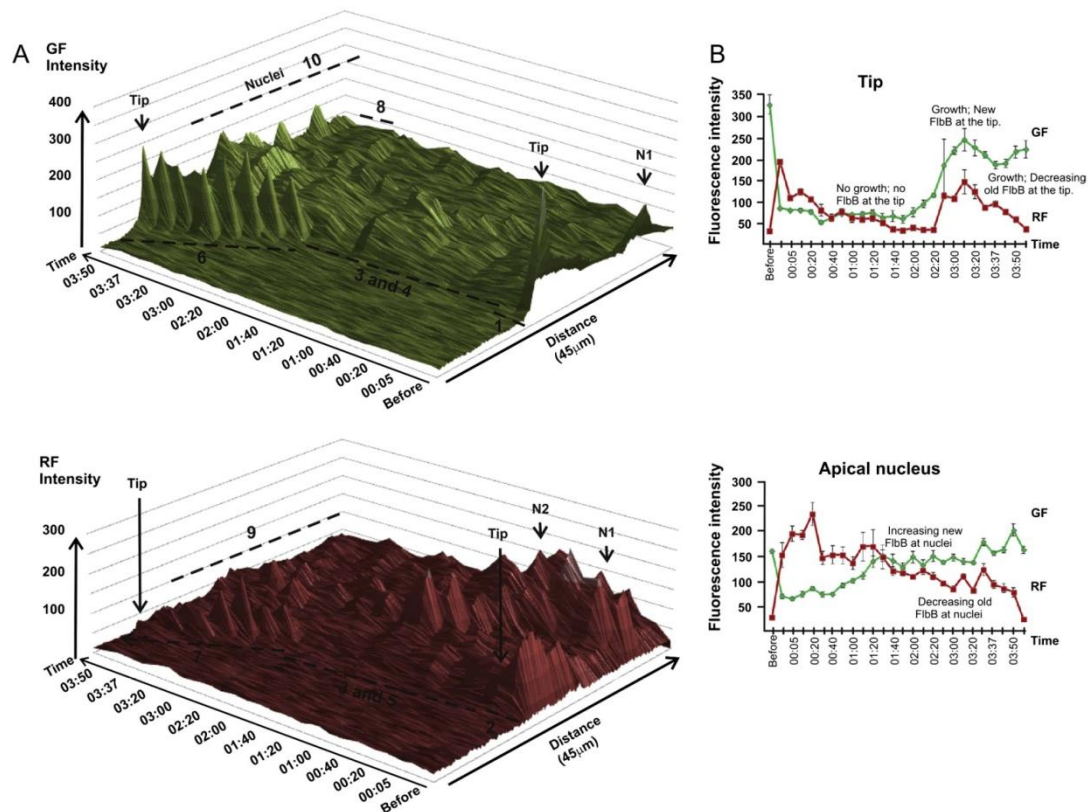


Fig. 6. Evolution of fluorescence along the hypha with time. (A) Three-dimensional plot showing the change in green (top) and red (bottom) fluorescence intensities (arbitrary units) along the hypha with time. Fluorescence intensity was measured according to the line drawn in the last DIC image of Fig. 5. N = nucleus. Numbers indicate: (1) Initial pool of FlbB before photo-conversion (tip and nuclei). (2) Photo-converted FlbB pool at nuclei and decreasing intensity at the tip. (3) No FlbB ("old" or "new" pool) at the tip. (4) Progressive recovery of nuclear green fluorescence with "new" FlbB. (5) Progressive decrease of nuclear red fluorescence ("old" FlbB). (6) New FlbB at the tip. (7) Progressive loss of apical red fluorescence. (8) Mitosis: loss of the nuclear localization of FlbB. (9) Loss of the nuclear old pool of FlbB after mitosis. (10) Recovery of new nuclear FlbB localization after mitosis. (B) Variation with time of the average (plus standard deviation) green (GF) or red (RF) fluorescence (arbitrary units) at the tip (top) or the most apical nucleus (bottom) of the vegetative hypha shown in Fig. 5. Time is represented in hours:minutes in both panels. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and third nuclei; Fig. 3B, bottom graphs; $N = 10$ hyphae; $p < 0.0004$ at the four points selected for analysis; significant difference). However, the qualitative distribution of FlbB at the tip and nuclei was similar in both *gpdA^{mini}*-driven strains since fluorescence intensity ratios between the tip and the first (most apical) nucleus, or second and first nuclei did not vary significantly (Fig. 3C). Fluorescence intensity ratio between the first nucleus and the tip changed from 0.91 ± 0.18 when tagging with GFP to 0.89 ± 0.24 in the case of Dendra2. When comparing the ratios between the second and first nucleus, they changed from 0.96 ± 0.14 (GFP) to 0.82 ± 0.10 (Dendra2; $N = 10$ hyphae; $p > 0.01$ in both comparisons; difference is not significant). Taking all these observations into consideration, we decided to proceed with photo-conversion experiments using the *gpdA^{mini}*-driven FlbB::Dendra2 strain.

3.2. Assessment of Dendra2 photo-conversion with irradiation intensity and time

Since long irradiation times during photo-conversion could damage the sample and result in cessation of hyphal growth, we

assessed the effect of various UV-light intensities (100%, 80%, 60% and 40% of the maximum) and irradiation times (2500, 5000 and 7500 ms at each intensity) on photo-conversion of FlbB::Dendra2 as well as on growth ($N = 4$ hyphae in each condition; Fig. 4 and Table 1). Green and red fluorescence images were acquired before and after photo-conversion to measure the decrease and the increase in the green and red signals achieved at the tip of each hyphae, respectively. New sets of green/red fluorescence images were acquired 5 and 10 min after photo-conversion to determine if the UV-exposition affected growth.

As expected, growth inhibition occurred at high light intensities and long photo-conversion times (Fig. 4 and Table 1). At the maximum lamp intensity, hyphal growth was inhibited at the three conversion times assayed (Fig. 4A). This coincided with the absence from the tip of both green and red signals 10 min after conversion (Fig. 4A, $t = 10'$). Although non-significantly, the decrease in green fluorescence tended to be deeper as the conversion time was increased. The average decrease in green fluorescence ranged from 45 ± 10 (%) when 2500 ms were used to 67 ± 6 (%) for UV exposures of 7500 ms. The red signal increased more than 600% in the three photo-conversion times (first row in Table 1).

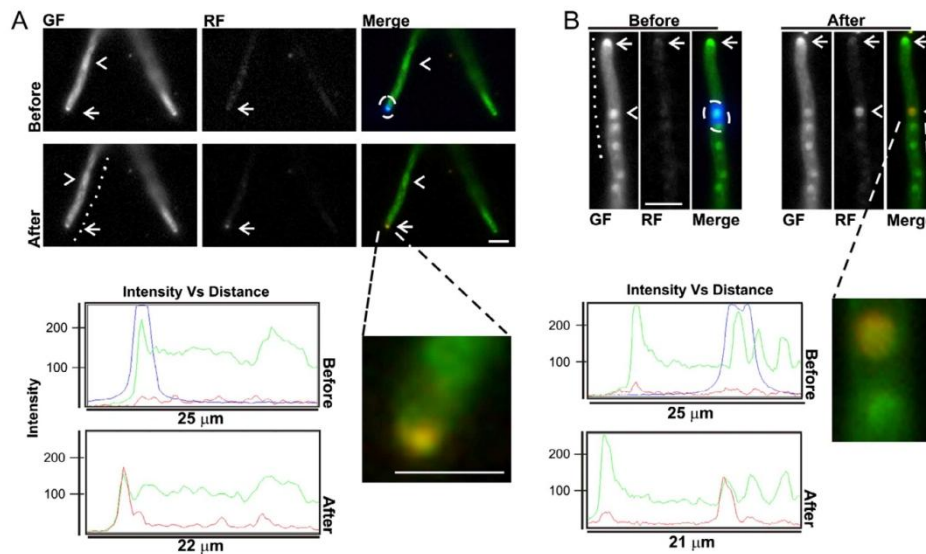


Fig. 7. Selective photo-conversion of regions of interest. Apical (A) and nuclear (B) pools of FlbB were selectively photo-converted. Both sets of panels show green and red fluorescence as well as merge images before and after photo-conversion. Plots below each set of images represent fluorescence intensity along the dotted lines. Magnifications of the tip or the apical nucleus are also shown. In both panels, photo-conversion was achieved by exposing ROIs to UV-light (80% of the maximum intensity) during 2500 ms. White arrows and arrowheads indicate tips and most apical nuclei, respectively. Dotted circles and the blue color represent the regions irradiated with UV-light. Scale bar in all panels = 5 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

When lamp intensity was reduced to an 80%, we measured similar photo-conversion efficiencies compared to those obtained with the maximum lamp intensity. Nevertheless, we observed that photo-conversion times of 2500 ms did not inhibit polar growth while longer UV-exposures did (Fig. 4B and second row in Table 1). The reduction of light intensity to 60% or 40% also relieved the effects on polar extension but this was accompanied by lower photo-conversion efficiencies (Fig. 4C and D; third and last rows in Table 1). Taking these results into consideration, we proceeded with the following experiments setting the light source at 80% of its maximum intensity and using photo-conversion times of 2500 ms, which did not inhibit growth, or longer, which did.

3.3. Tracking of FlbB::Dendra2

As a proof of concept for the use of Dendra2, we tried to reproduce known features of FlbB localization and dynamics. Vegetative hyphae were irradiated for 8 s with UV light (80% of lamp intensity) and followed for 4 h. The entire time-lapse succession of images can be seen in [Supplementary Video 1](#) (DIC, and green and red fluorescence at top, middle and bottom panels, respectively) while Fig. 5 shows selected frames. [Supplementary Video 2](#) provides with an additional view of [Supplementary Video 1](#), since it shows the surface plots for green (non-photoconverted and “new” FlbB pools) and red (photo-converted, “old” pool) channels. Finally, Fig. 6 shows the evolution of red and green fluorescence intensities along the hypha with time. As expected, green fluorescence was detected at the tip and nuclei before photo-conversion while red fluorescence was undetectable (labeled as “before” in Figs. 5 and 6A & B). After irradiation, we detected markedly higher levels of red fluorescence but very low green fluorescence ($t = 00:00$, hours:minutes, in Figs. 5 and 6A & B). FlbB accumulation at the apex (either red or green forms) disappeared while green fluorescence slightly increased and red fluorescence decreased in

nuclei with time ($t = 00:05$ to $02:20$). The absence of FlbB from the tip was maintained until the recovery of the ability to grow ($t = 02:45$). It was observed that, after this time-point, the green fluorescence at the tip increased while the red fluorescence gradually disappeared ($t = 02:45$ to $04:00$). FlbB was not accumulated in nuclei in mitosis while it was retained at the tip, as previously described by us ($t = 03:33$ in Fig. 5; Etxebeste et al., 2009). The accumulation of the transcription factor at the tip at this time-point might be a consequence of the maintenance of active polar growth machinery. It has been previously described that the growth rate of hyphal tip cells does not change significantly in mitosis compared to the interphase (Horio and Oakley, 2005; Riquelme et al., 2003) and that hyphal growth and cell-cycle are independent processes in filamentous fungi (Riquelme et al., 2003). The end of nuclear division led to the detection of green but not red fluorescence at nuclei ($t = 04:00$; Etxebeste et al., 2009). Overall, this experiment reproduced previously known features of FlbB, proving that Dendra2 is a valid tool for localization and dynamic analyses.

3.4. Photo-conversion of specific FlbB subcellular pools

The possibility of photo-converting specific subcellular pools of FlbB was also analyzed. Green and red fluorescence images of the entire field of view were acquired before photo-conversion. Then, the ROI, namely the tip or the most apical nucleus, was centered and a diaphragm slider (Carl Zeiss) was used to reduce the field of view to a pinhole size of 4–5 μ m (dotted circles in Fig. 7A and B, respectively). The ROI was then irradiated (80% intensity; blue color in Fig. 7) during 2500 ms to induce the green-to-red conversion of Dendra2 without inhibiting hyphal extension and, thus, FlbB accumulation at the tip. Finally, the diaphragm was reopened to compare green and red fluorescence intensities within the hypha. Results show that subpopulations of a protein can be

selectively photo-converted, allowing the tracking of protein movement within the fungal cell (see Conclusions).

4. Conclusions

Two tagging protocols have been adapted for the use of Dendra2 in the study of *A. nidulans* proteins. The first one is based on the fusion-PCR technique (Yang et al., 2004) and drives the expression of the Dendra2-tagged protein through the native promoter. This strategy may be suitable for the study of proteins with high expression levels. The second one uses the constitutive *gpdA^{mini}* promoter (Pantazopoulou and Peñalva, 2009), which ensures high expression levels during vegetative and developmental stages of the *A. nidulans* life-cycle (Garzia et al., 2013). According to our RNA-seq data (Garzia et al., 2013), transcripts for more than 2500 genes (approximately 23.4% of the total) were undetectable or almost undetectable (FPKM < 5.0) in vegetative hyphae. Thus, this second protocol might be suitable for the study of the dynamics of proteins that otherwise could not be analyzed. As shown in this work, an obvious drawback of Dendra2-tagging is the significantly lower fluorescence intensity compared to GFP. *gpdA^{mini}*-driven expression contributes partially to overcome this disadvantage.

As a proof of concept for the usefulness of Dendra2, we confirmed previously known features of FlbB dynamics at the tip and nuclei (Etxebeste et al., 2010). FlbB participates in conidiation signaling at the tip (Garzia et al., 2009) and this localization is tightly linked to the polar extension machinery. The accumulation of FlbB at the tip occurs exclusively when the hypha is growing apically. Furthermore, the selective photo-conversion of the apical or nuclear pools of FlbB paves the way for dynamic analyses of proteins that cannot be tracked through stream acquisitions. After photo-conversion of a ROI, the redistribution of the red fluorescence would inform about the directionality of the protein movement between two cellular compartments. Dendra2 also opens an avenue for the use of additional PCFP, PAFP or PSFPs in filamentous fungi, which in combination with a glossary of advanced microscopy techniques (i.e., FRAP, FLIP, iFRAP, PALM, STORM, FRET, FLIM, etcetera; Day and Davidson, 2009) might become a powerful tool for the analysis of protein localization and dynamics. For example, labeling of *A. nidulans* proteins with the monomeric PCFP mEOS have been successfully coupled with super-resolution microscopy techniques as PALM (photo-activated localization microscopy) to enable an accurate study of the localization of cell-end markers and membrane-rafts (Takeshita, personal communication).

The main advantages of the procedure presented in this work are summarized below. Firstly, the procedure is easy to go through. It is based on PCR, cloning, transformation and microscopy protocols that are standard to most *Aspergillus* laboratories (Nayak et al., 2006; Pantazopoulou and Peñalva, 2009; Penalva, 2005; Tilburn et al., 1983; Yang et al., 2004). Secondly, the protocol is flexible. PCR, cloning and transformation strategies used here can be modified, substituted or combined in different ways to tag any protein with Dendra2 or PCFPs at either N- or C-termini. Improved and versatile cloning and transformation procedures have been recently described for different filamentous fungal species, as that based on the Golden-gate cloning system for *Ustilago maydis* and *A. nidulans* (Terfruchte et al., 2013) or the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Penicillium chrysogenum* (de Boer et al., 2013). Finally, the procedure is economically feasible mainly because a confocal microscope and a laser are not mandatory. The region of the sample that will be analyzed can be reduced using a diaphragm slider (Baker et al., 2010; Vorvis et al., 2008) and photo-conversion of Dendra2 can be

achieved using microscopes equipped with standard mercury arc lamps.

Acknowledgments

This work has been supported by the Basque Government through Grant IT599-13 as well as by Ministerio de Economía y Competitividad through Grant BFU2010-17528. E.P.N.A held a pre-doctoral fellowship from the University of The Basque Country (UPV/EHU). We are especially grateful to Dr. Marc S. Cortese, Dr. Eduardo A. Espeso and Dr. Unai Ugalde for their careful reading of the manuscript. Technical and human support provided by Dr. Ricardo Andrade, from the SGIker microscopy service (UPV/EHU, MINECO, GV/EJ, ERDF and ESF), is gratefully acknowledged. We also thank Ivan González, from Carl Zeiss Microscopy, for his valuable technical assistance.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.006>.

References

- Baker, S.M., Buckheit III, R.W., Falk, M.M., 2010. Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol.* 11, 15.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2007a. Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nat. Protoc.* 2, 2024–2032.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2007b. Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* 42, 553, 555, 557.
- Day, R.N., Davidson, M.W., 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2887–2921.
- de Boer, P., Bronkhof, J., Dukismall kje, M.K., Kerkman, R., Touw, H., van den Berg, M., Offringa, R., 2013. Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches. *Fungal Genet. Biol.* 61, 9–14.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., Espeso, E.A., Ugalde, U., 2008. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 7, 38–48.
- Etxebeste, O., Herrero-García, E., Araujo-Bazan, L., Rodríguez-Urrea, A.B., Garzia, A., Ugalde, U., 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., Ugalde, U., 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18, 569–576.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Fischer, R., Espeso, E.A., Ugalde, U., 2009. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* 71, 172–184.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Ugalde, U., 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., Rodríguez-Romero, J., Fischer, R., Espeso, E.A., 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.
- Horio, T., Oakley, B.R., 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 918–926.
- Jasik, J., Boggetti, B., Baluska, F., Volkmann, D., Gensch, T., Rutten, T., Altmann, T., Schmelzer, E., 2013. PIN2 turnover in *Arabidopsis* root epidermal cells explored by the photoconvertible protein Dendra2. *PLoS ONE* 8, e61403.
- Nayak, T., Szcwyczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., Oakley, B.R., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Onischenko, E., Stanton, L.H., Madrid, A.S., Kieselbach, T., Weis, K., 2009. Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* 185, 475–491.
- Pantazopoulou, A., Peñalva, 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., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975.

- Penalva, M.A., Galindo, A., Abenza, J.F., Pinar, M., Calcagno-Pizarelli, A.M., Arst, H.N., Pantazopoulou, A., 2012. Searching for gold beyond mitosis: mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist.* 2, 2–14.
- Riquelme, M., 2013. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 587–609.
- Riquelme, M., Fischer, R., Bartnicki-Garcia, S., 2003. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* 222, 211–215.
- Scholz, D., Fortsch, J., Bockler, S., Klecker, T., Westermann, B., 2013. Analyzing membrane dynamics with live cell fluorescence microscopy with a focus on yeast mitochondria. *Methods Mol. Biol.* 1033, 275–283.
- Terfruchte, M., Johnk, B., Fajardo-Somera, R., Braus, G.H., Riquelme, M., Schipper, K., Feldbrugge, M., 2013. Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet. Biol.*
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., Davies, R.W., 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221.
- Vorvis, C., Markus, S.M., Lee, W.L., 2008. Photoactivatable GFP tagging cassettes for protein-tracking studies in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 25, 651–659.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon III, J., Adams, T.H., 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27, 62–69.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P., Dou, X., Perez-Balaguer, A., Osmani, S.A., 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.

ANEXO 4. Artículo científico

Molecular Microbiology (2015) 98(4), 607–624 ■

doi:10.1111/mmi.13156
First published online 4 September 2015

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

Erika Herrero-García,^{1†}
Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi,^{2†}
Marc S. Cortese,² Ane Markina-Iñarrairaegui,²
Elixabet Oíartzabal-Arango,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 (Araújo-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 (Etxebeste *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 Peñalva, 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* (Etxebeste *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 ± 0.10 ; 1.08 ± 0.09 ; and 1.02 ± 0.16 for strains expressing one, two or multiple copies of the plasmid, respectively], compared to a ratio of 1.48 ± 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 ± 0.22 , 1.39 ± 0.44 and 1.78 ± 0.35 for single, double and multi-

ple copy strains, respectively, compared to a ratio of 0.64 ± 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 (Etxebeste *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 alanine 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

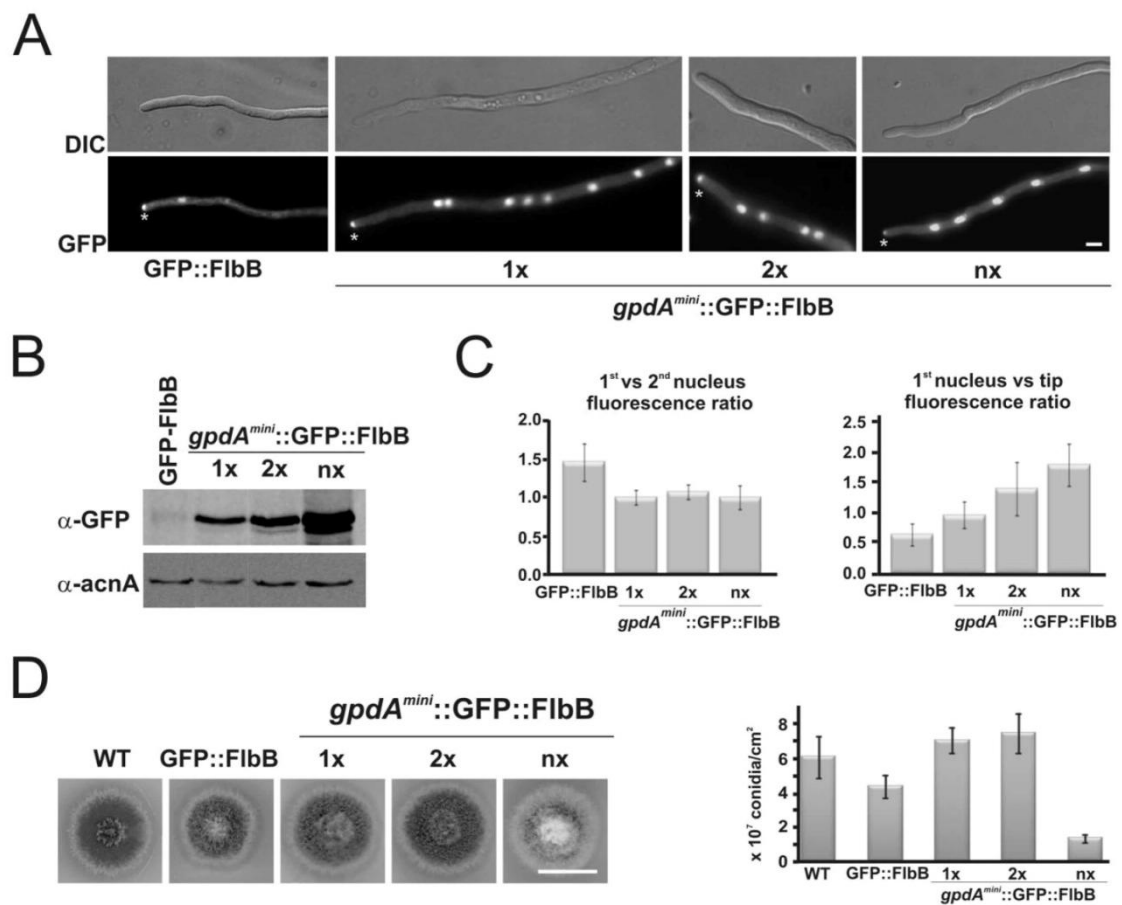


Fig. 1. Overriding the asymmetric nuclear distribution of FibB by constitutive expression.

A. Subcellular localization of GFP::FibB in cells from strains expressing one, two or multiple copies of the *pgpdA^{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 *pgpdA^{mini}::GFP::FibB*. GFP::FibB protein is barely detected when expressed by *fibB⁺* 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.

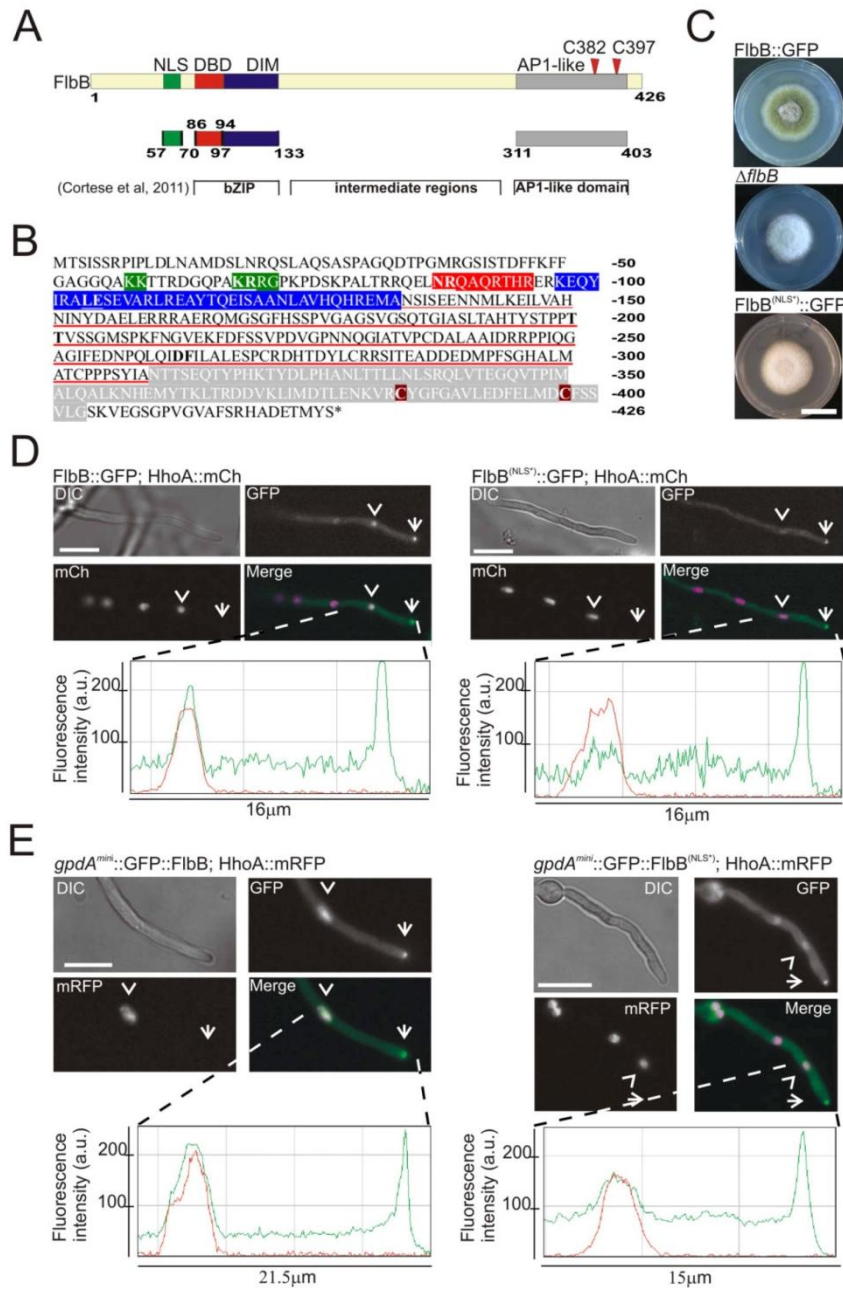


Fig. 2. Defining the NLS in FibB.

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, Δ *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^{mtl}* 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.

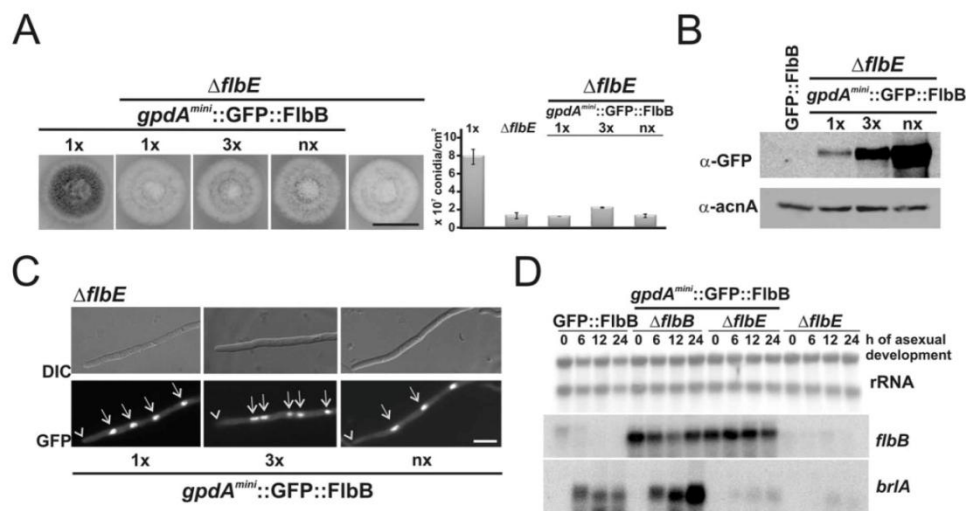


Fig. 3. Effect of *flbE* deletion on FibB localization and activity.

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 (Araújo-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

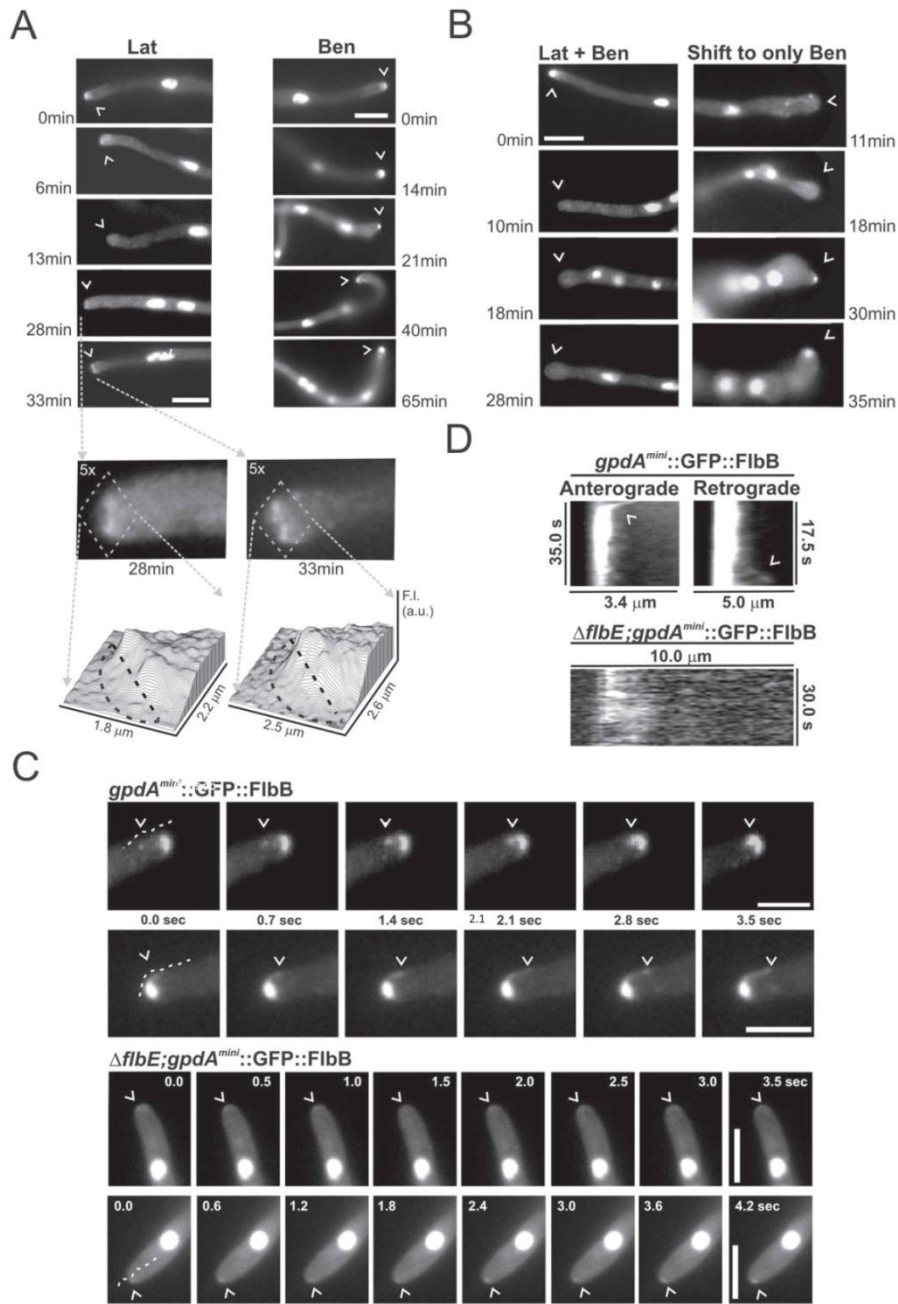


Fig. 4. Role of actin and microtubule cytoskeletons in FibB migration to the apex. **A.** Localization of a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB chimera in MMA containing 100 μM latrunculin B (left) or 2.4 μg ml⁻¹ benomyl (right). Magnifications (5×) and surface plots show the subapical accumulation of FibB caused by the addition of latrunculin B. Scale bars = 5 μm. **B.** GFP::FibB 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 μm. **C.** Stream-image captures showing *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB patches moving in anterograde and retrograde directions in wild-type and *ΔflbE* backgrounds. Arrowheads indicate mobile patches (up) and tips (down). Scale bar in all panels = 5 μm. The dotted lines indicate the regions analyzed in the kymographs in panel D.

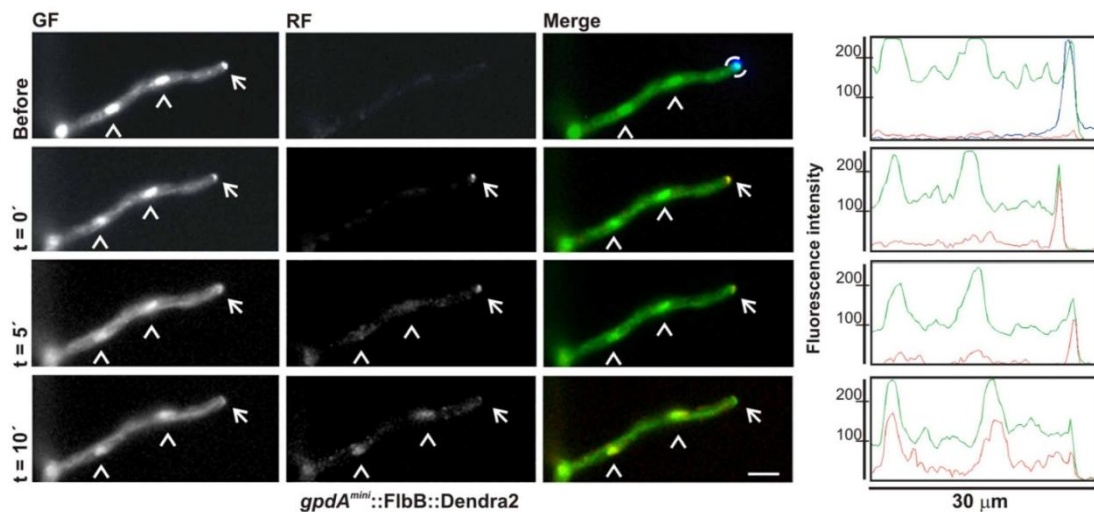


Fig. 5. Retrograde movement of FibB::Dendra2 from the tip to nuclei. Green, red fluorescence and merged images are shown before and at 0, 5 and 10 min after selective photo-conversion of the tip (blue color within the dotted circle in top panel). Plots next to each set of images represent fluorescence 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 $\Delta flbE$ 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 *flbB²*-driven

GFP::FibB 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 *fibB* mutants (Fig. S1B; Etxebeste *et al.*, 2008). None of the truncated GFP::FibB forms could accumulate at the tip or nuclei (Fig. S1C). Western blot assays showed a sharp decrease of truncated FibB 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::FibB or the GFP::FibB^(1–361) form. The strain expressing multiple copies of GFP::FibB^(1–361) showed an aconidial phenotype that instead of being the consequence of a decreased FibB concentration seemed to be caused by the absence of FibB from the tip (Fig. 6A–C).

Two cysteine residues within the AP1-like C-terminal region of FibB are also highly conserved among FibB 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 FibB 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 FibB. Strains expressing GFP-tagged FibB^(C382A) or FibB^(C397A) chimeras were generated. Fig. 6D and E show that the ability to conidiate and the localization of FibB was not altered in the GFP::FibB^(C397A) mutant, whereas both GFP::FibB^(C382A) or GFP::FibB^(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 FibB levels (Fig. 6F). In order to ascertain whether this mutation affected FibB protein levels, strains bearing one, two or multiple copies of a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB^(C382A) chimera were generated. All strains were aconidial (Fig. 6G) and, despite the increasing protein levels (Fig. 6H), FibB remained undetected at the tip but accumulated in all nuclei (Fig. 6I). This nuclear pool of FibB could not induce *brlA* expression (Fig. 6J). Thus, Cys382 play an important role in the retention of FibB at the tip and the acquisition of its transcriptional regulatory activity (see below).

A predicted dimerization domain within the bZIP of FibB mediates interaction with FibE 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 FibB (DIM; blue color in Fig. 7A). First, we analyzed the ability of GST-tagged full-length or truncated forms of FibB to retain an FibB::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 FibB::HA_{3x}.

Second, we performed a deep bioinformatic analysis of the hypothetical dimerization domain of FibB 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 FibB DIM domain contains only two. However, the predicted DIM domain of FibB 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 FibB 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 *fibB²*-driven GFP::FibB^(DIM*) showed an aconidial phenotype, and this was associated to the steep decrease in FibB levels and the lack of FibB accumulation in any subcellular compartment (Fig. 7C–E). Because the described decrease in FibB levels induced by the DIM* mutations masked their effect on the subcellular localization of the TF, a strain expressing a *gpdA^{mini}*-driven GFP::FibB^(DIM*) chimera was generated. In this strain, mutant protein FibB^(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 FibB::HA_{3x} was also strongly affected in the DIM* mutant (Fig. 7F). However, this interaction was mediated by FibE, as indicated by pull-down assays using crude protein extracts from a $\Delta fibE$; FibB::HA_{3x} strain (Fig. 7G).

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

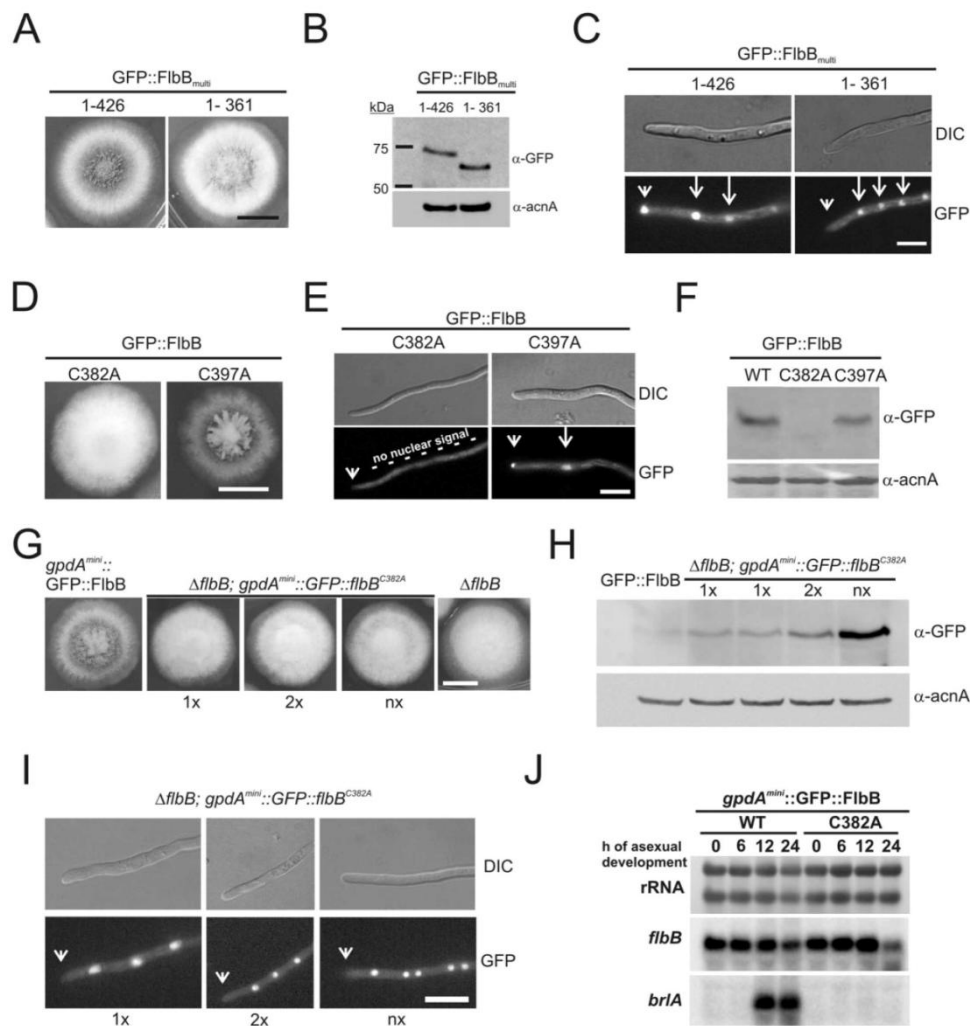


Fig. 6. Characterization of the C-terminal domain of FibB.

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

B. Western blot assays showing GFP::FibB⁽¹⁻⁴²⁶⁾ and GFP::FibB⁽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 *fibB*⁺-driven GFP::FibB^(C382A) or GFP::FibB^(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 *pgpdA*^{mini}::GFP::FibB^(C382A) plasmid compared with that expressing the wild-type chimera or the $\Delta fibB$ strain, after 48 h of culture in MMA at 37°C. Scale bar = 1 cm.

H. Western blot assay showing the higher GFP::FibB^(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::FibB^(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 *fibB* and *brlA* expression levels in *gpdA*^{mini}::GFP::FibB and *gpdA*^{mini}::GFP::FibB^(C382A) strains at the vegetative stage and 6, 12 or 24 h after the induction of conidiation. rRNA is used as loading control.

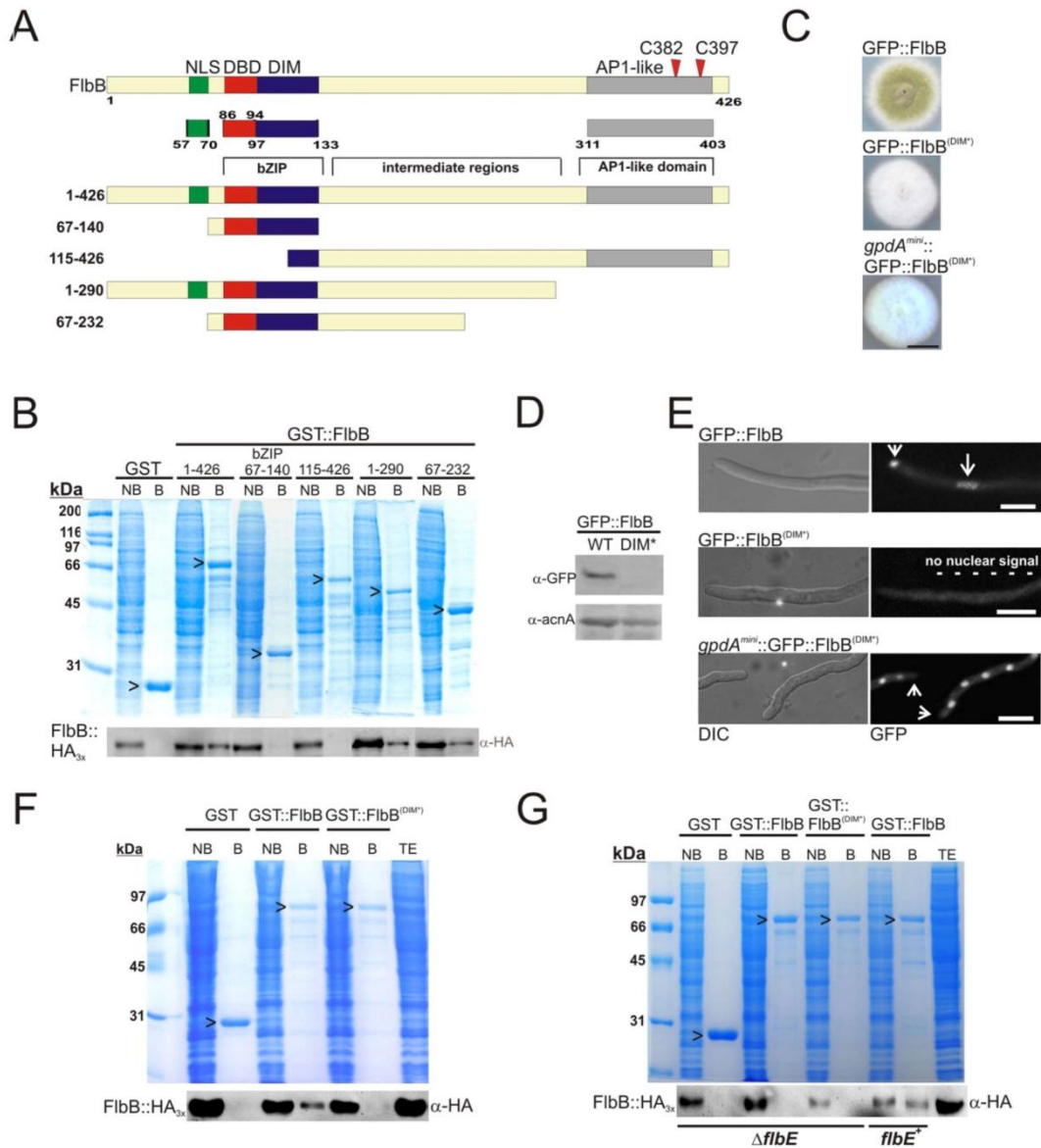


Fig. 7. Role of the dimerization domain in the accumulation of FibB at the tip. **A.** Representation of the truncated GST-tagged FibB forms generated. Residues comprising each of the truncated proteins are indicated on the right side. **B.** Pull-down assays using as bait the truncated forms shown in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

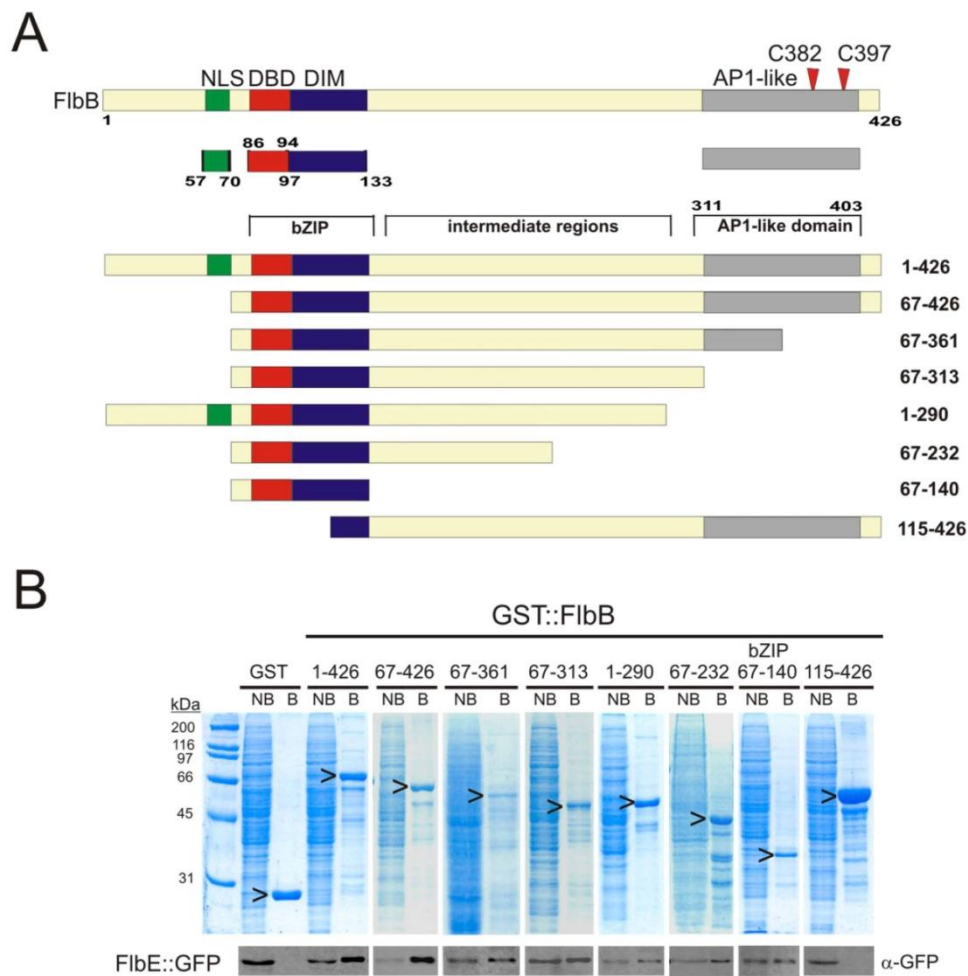


Fig. 8. The bZIP domain of FibB is essential for the interaction with FibE.

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

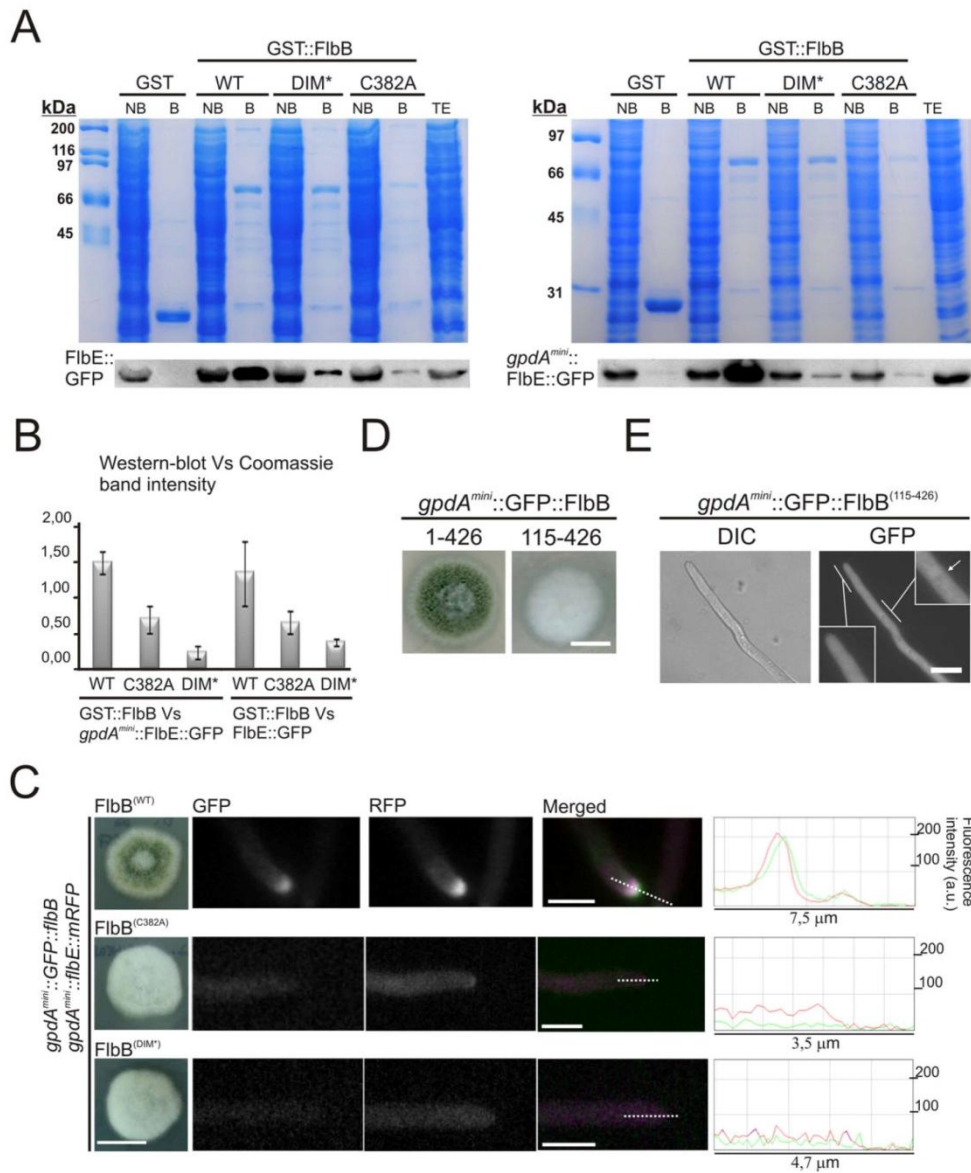


Fig. 9. Interaction between FibE and FibB is affected by the lack of residues L104 and E105 or C382. **A.** Pull-down assays using as bait GST alone, or GST::FibB, GST::FibB^(DIM*) or GST::FibB^(C382A) chimeras and total protein extracts from strains expressing an *fibE*²- (left) or a *gpdA*^{mini}-driven (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 syncytium.

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, synaptical 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-

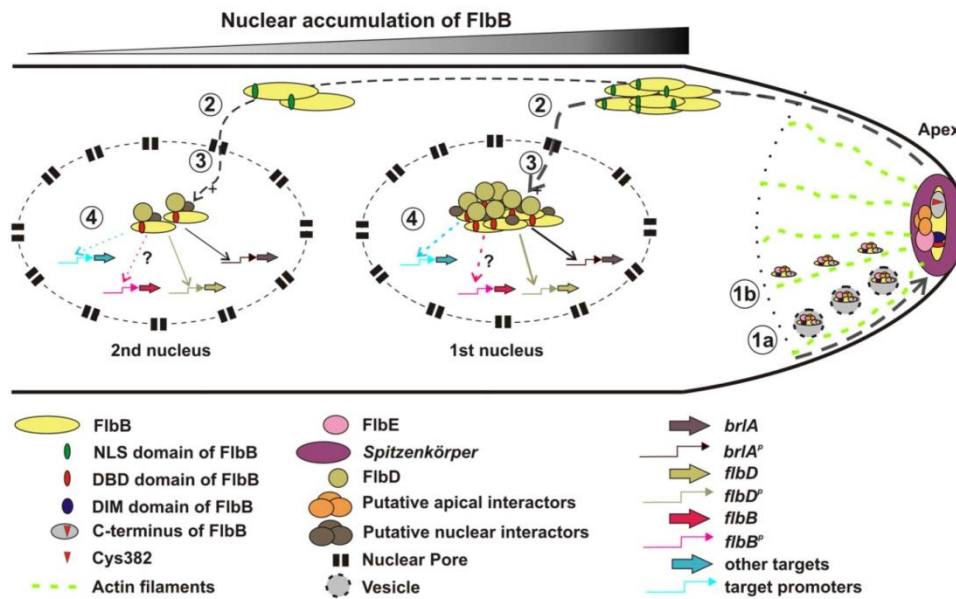


Fig. 10. A model depicting the relationship between apical and nuclear pools of FibB.

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 through the nuclear pore, 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*²-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-Iñárraegui *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 FibB 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 FibB 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-Iñarrairaegui *et al.*, 2011; Etxebeste *et al.*, 2013).

The transcriptional activity of FibB 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 FibB concentration are dependent on FibB activity. On the other hand, RNA sequencing experiments identified transcriptional targets of FibB 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 (Oiartzabal-Arano *et al.*, 2015).

Overall, the succession of events summarized in Fig. 10 illustrates various roles of FibB 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 Peñalva, 2009) for the constitutive expression of *flbB* had previously been verified by us (Perez-de-Nanclares-Arregi and Etxebeste, 2014). Construction of *pgpdA^{mini}::GFP::FibB* plasmid was based on *pgpd003* (Fig. S5; Pantazopoulou and Peñalva, 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::FibB* plasmid (see below). Correct orientation of GFP fused to the FibB

N-terminus was confirmed, and the fragment encoding GFP::FibB was extracted using *Nco*I-*Eco*RI enzymes. The ligation of this fragment into *pgpd003* generated the plasmid *pgpdA^{mini}::GFP::FibB*, which was used as template to introduce point mutations within FibB. 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 *pgpdA^{mini}::GFP::FibB* 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::FibB strains, plasmid *pBSK-pyroA⁺::GFP::FibB* 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 Asp718 restriction sites (Fig. S2A). The insert was ligated into a *pBSK-pyroA⁺* plasmid (Garzia *et al.*, 2009) to generate the recombinant *pBSK-pyroA⁺::GFP::FibB* 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::FibB* 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 FibB::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-FibB⁺* 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 FibB or FibB 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-Iñarrairaegui *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; Peñalva, 2005) and incubated for 18 h at 25°C. The association of FibB localization to different cytoskeletal networks was analyzed

essentially as described in Araújo-Bazán *et al.* (2008), using 100 μ M Latrunculin B (Calbiochem) and/or 2.4 μ 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 OD₆₀₀ = 0.6–0.8, 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 Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄) 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.cs.toronto.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.
- Araújo-Bazán, L., Peñalva, 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.
- Araújo-Bazán, 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-Yakov, 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.
- 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 FibB 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 FibB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**: 38–48.
- Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araújo-Bazán, L., Rodríguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2009) The bZIP-type transcription factor FibB 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, Peñalva, 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* FibE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FibB. *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 FibB and FibD 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-Iñarrairaegui, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araújo-Bazán, L., Fernández-Martínez, J., Flores, J.A., *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **22**: 3874–3886.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Diez, E., and Peñalva, M.A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* **21**: 1688–1699.
- Oíartzabal-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 FibB. *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 Peñalva, M.A. (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**: 4335–4347.
- Peñalva, M.A. (2015) A lipid-managing program maintains a stout Spitzenkorper. *Mol Microbiol* **97**: 1–6.
- Peñalva, 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., Araújo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Peñalva, 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.

ANEXO 5. Revisión

Curr Genet
DOI 10.1007/s00294-015-0556-0



REVIEW

Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*

Elixabet Oiartzabal-Arano¹ · Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi¹ ·
Eduardo A. Espeso² · Oier Etxebeste¹

Received: 1 December 2015 / Revised: 11 December 2015 / Accepted: 12 December 2015
© 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-García 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.eus

¹ Biochemistry II Laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country (UPV/EHU), Manuel de Lardizabal, 3, 20018 San Sebastian, Spain

² Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Published online: 18 January 2016

Springer

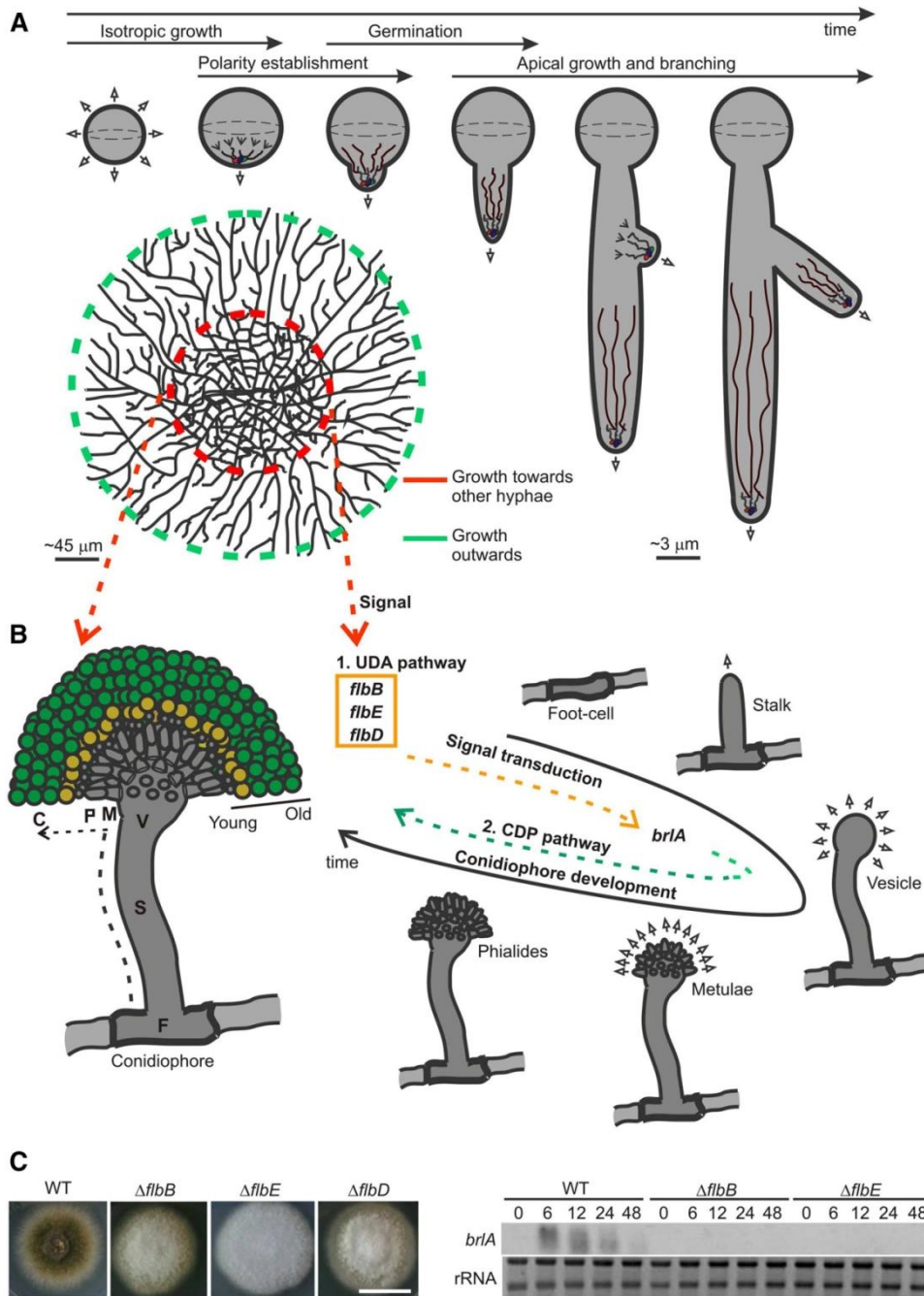
of the invasive phase (Fig. 1a). A combination of external (air, light or stress) and internal (metabolites) cues causes in *A. nidulans* the induction of asexual development (Etxebeste et al. 2010; Rodriguez-Urra et al. 2012) resulting in the production of structures called conidiophores (Fig. 1b; see 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* (*fluffy, 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 acnidial 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

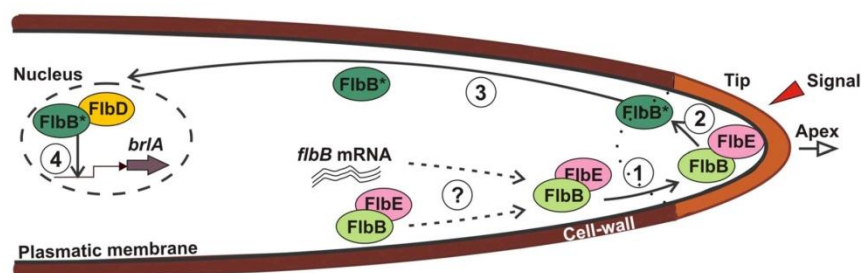


Fig. 2 FlbB dynamics and transcriptional activity in vegetative hyphae. Numbers indicate the analyses suggested in the main text. 1 and 3 identification and characterization of proteins that mediate anterograde and retrograde migration of FlbB; 2 identification

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 (Oiartzabal-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) (Alkahyyat et al. 2015; Bayram et al. 2010; Bayram and Braus 2012; Calvo 2008; Lee et al. 2014; Oiartzabal-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 EHUA15/08) 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
- Alkahluyat 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 GcnE (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, Czymmek 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-Urria 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: Kues 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-Garcia 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-Garcia 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
- Gutierrez-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-Garcia 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-Garcia E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Cortese MS, Markina-Inarrairaegui A, Oartzabal-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
- Oartzabal-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
- Rodriguez-Urra AB, Jimenez C, Nieto MI, Rodriguez 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

