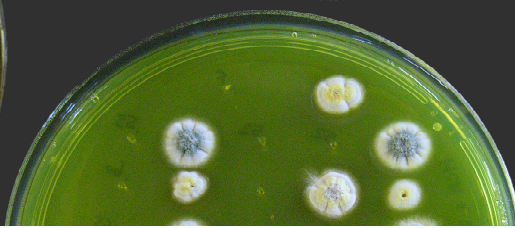
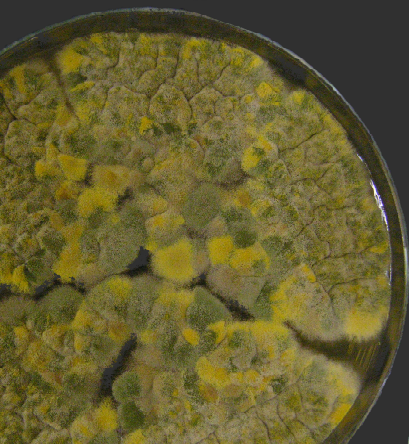
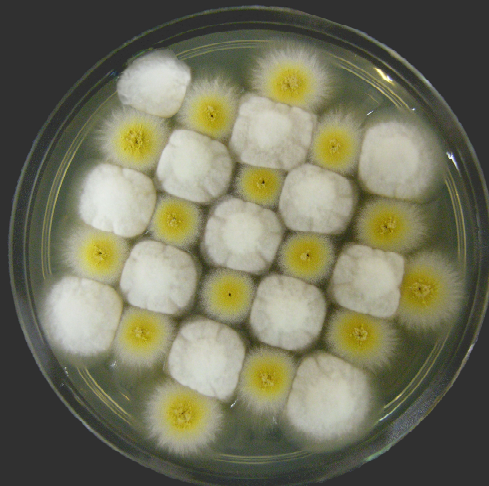


# Garapen asexualaren kontrola *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoan: FlbB transkripzio faktorea eta erregulatzaile berrien ezaugarritze funtzionala

Ainara Otamendi  
Donostia 2020





BIOLOGIA-BIOKIMIKA II  
Kimika Aplikatua  
Kimika Zientzien Fakultatea  
Donostia



**Garapen asexualaren kontrola *Aspergillus nidulans*  
harizpi itxurako onddoan: FlbB transkripzio faktorea eta  
erregulatzaile berrien ezaugarritze funtzionala**

Kimika Aplikatua eta Material polimerikoak Doktoregoa eskuratzeko aurkeztutako  
memoria,

Ainara Otamendi Elizalde

2020

Doktorego Tesiaren Zuzendaria:

Oier Etxebeste Juárez

Irakasle Agregatua

Kimika Zientzien Fakultatea

EHU/UPV





Doktorego Tesi lan hau Donostiako Kimika Zientzien Fakultatean (EHU/UPV) burutu da, Oier Etxebeste Juárez Doktorearen, EHU/UPV-ko Irakasle Agregatuaren, zuzendaritzapean.

Memoria honetan jasotako lanak Eusko Jaurlaritzak IT599-13 proiektuaren bitartez eta, EHU-k EHUA15/08, PPGA19/08 eta GIU19/014 proiektuen bitartez emandako diru publikoaz finantzatuta dira; bai eta Eusko Jaurlaritzak, Doktoretza aurreko programaren barruan, doktore ez diren ikertzaileak prestatzeko Ainaro Otamendi Elizalde doktoregaiari esleitutako bekari esker.



**Eskerrik asko,  
noraeean aurkitu naizen bakoitzean  
nire iparrorratz izan zareten  
guztiori!**

**Eskerrik asko,  
hartutako norantza edozein zelarik ere  
bidelagun izan zaituztedanoi!**





## **Eskertza:**

*Eskerrak ematen nondik hasi ere kosta egiten zait, lerroak eta lerroak bat bestearen atzetik idazten hasi beharrea naiz berriz ere. Eskerrik asko...*

*Hasteko zuri, Unai, laborategiko ateak ireki izanagatik, bai eta zure irakaspenengatik. Zuk emandako aukera hau gabe ezin izango nion doktoretzaren erronkari heldu.*

*Muchas gracias Edu, ya a estas alturas casi podría escribirte estas frases en euskara, pero así practico un poco. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, a pesar de los kilómetros siempre te he sentido cerca. Nunca olvidare mi estancia en Madrid, a tu lado aprendí a mirar los recovecos de Aspergillus y de la ciencia. Eskerrik asko, algún día volveré a Madrid para conocer los recovecos de la ciudad.*

*Zuri Oier, eskerrak ematea gutxi da. Mila esker irakatsitako guztiagatik, izandako pazientzia eta eskainitako arreta guztiagatik. Eta bereziki emandako aukera gogor baina eder honengatik. Eta beste hainbeste esker eman beharrea naiz maila pertsonalean izan duzun ulerkortasunagatik eta babesagatik. Arrazoi zenuen doktoregotzak markatu egiten zaitu.*

*Laborategiko egunerokoak jende zoragarria ezagutzeko aukera eman dit, eta doktorego tesiaren alderdi pertsonalean izugarritzko zortea izan dut. Nire hasierak zuekin, Eli O., Eli P. eta Ane, oroituko ditut beti. Zenbat galdera egin ote nizkizuen hasiera haietan... astuna izatearen beldur nintzen baina beti babestuta eta erantzun bat esku artean sentitu naiz. Zuen gaitasun profesionaletik haratago, esker mila laborategitik kanpo ere partekatutako momentu guztiengatik. Sekula esan ez badizuet, orain da momentua, zoragarriak zarete.*

*Nola ez zuei Martzel eta Mikel, hasieratik azken etapara arte elkarrekin aritu gara, eta eskerrik asko egunerokoa errazagoa egiteagatik. Egunero irri bat atera izanagatik, eta zuen xeblekeria nahiz irri arteko momentu ugariengatik. Baina baita alaitasuna nagusi ez zenean ere hor*

*egoteagatik eta laguntzeagatik. Martzel eskerrik asko ezezkorik ez onartzeagatik... nire egoskortasuna maila gorenera igo duzu. Zuri Mikel nire bizilagun izan zarena, face to face, eskerrik asko laguntza behar nuen bakoitzean erakutsi izan didazun laguntzeko prestutasunagatik. Zuri ez dizut ezezkorik entzun sekula. Handietan handienak zarete.*

*Nola ez laborategiko girotik haratago, lagundu nauzuen guztiei. Zertan ari nintzen ulertu ez baina babestu nauzuen guztioi. Zer ikertzen nuen galdetu eta ulertu gabe ere interes aurpegia jarri duzuenoi, nahiz aurpegi arraroak jarri dituzuenoi. Eskerrik asko nire lagunarteari, nik baina pazientzia gehiago duzuela erakutsi izan didazue, jatordu eder bat zor dizuet. Eta bereziki zuri Ainhoa, nire ahizpa postiza zaren aldetik beti hor egoteagatik. Eta nola ez, niri irri bat ateratzeko mundu honetan gaitasun handiena duten hiru txikitxoei Mikel, Markel eta Oinatz. Eskerrik asko taldekoei ere, bai eta inguruan dudan jende guztiari ere; izenak aipatzen hasi beharko banu azken eranskin bat gehitu beharko nuke oraindik.*

*Senitartekoei ere eskertu beharrean naiz, momenturik latzenetan inork baina gehiago babestu nauzue. Zortekoa naiz ditudan abizen eta izana edukitzeagatik. Zuri ama ere eskertu beharrean naiz, nahiz eta makina bat aldiz doktoretza uzteko esan didazun, gai nintzela erakusteko egoskorkeri hutsagatik aurrera bultzatu nauzu.*

*Eta azkenik, nola ez, zuri aita. Lanaren balioa erakutsi zenidan, nekeak neke lanean jarraitu behar dela, seguruenik zure irakaspenak doktoregotza aurrera eramaten lagundu dit. Eskerrik asko, zertan nenbilen jakin ez eta ulergaitza zitzaizun arren; nigan zenuen konfiantzagatik, egiten nuen bidea egiten nuela ere zuzena izango zela ez zenuen ezbaian sekula jarri. Zure hutsunea sentitzen dudan arren, aurrera egiteko nire indarra zara. Erdi erdian joan bazinen ere, hasitakoa bukatu dudala erakutsi nahi nizuke. Espero dut harro egotea zure irakaspenera bete dudala ikusteaz! Maite zaitut!*

## LABURDURAK

|           |   |
|-----------|---|
| 3'-UTR:   | <i>3'untranslated region</i> edo itzuli gabeko 3' eremua  |
| 5'-UTR:   | <i>5'untranslated region</i> edo itzuli gabeko 5' eremua  |
| AAA+:     | <i>ATPases Associated with various Activities</i>   |
| Afum:     | <i>Aspergillus fumigatus</i>  |
| AspGD:    | <i>Aspergillus Genome Database</i>  |
| ATAC-seq: | <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>  |
| ATP:      | <i>Adenosine triphosphate</i> edo adenosina trifosfatoa   |
| BICD2:    | <i>Bicaudal-D2</i>  |
| bp:       | Base pareia   |
| bZIP:     | <i>Basic Leucine Zipper Domain</i> edo leuzinen kremailera eremua   |
| bHLH:     | <i>Basic Helix-Loop-Helix</i>   |
| cAMP:     | <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> edo Adenosin monofosfato ziklikoa                                   |
| CDP:      | <i>Central developmental pathway</i> edo garapen bide nagusia   |
| Chr:      | <i>Chromosome</i> edo kromosoma   |
| CHIP:     | CHIP: <i>Chromatin immunoprecipitation</i> edo kromatina immunoprezipitazioa                              |
| COP:      | <i>Coat Protein Complex</i> edo proteina estaldura konplexua  |
| CPR:      | <i>cAMP receptor protein</i> edo cAMP-ren proteina errezeptorea   |
| Cryo-EM:  | <i>Cryogenic electron microscopy</i> edo elektroik mikroskopia kriogenikoa                                |
| CSPD:     | Disodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1]decan}-4-yl)phenyl phosphate |
| DNA:      | <i>Deoxyribonucleic acid</i> edo azido desoxierribonukleikoa  |
| DIC:      | <i>Differential interference contrast</i> edo fase kontrasteko mikroskopia                                |
| DTT:      | <i>1,4-dithiothreitol</i> edo 1,4-diotreitola   |
| EDTA:     | EDTA: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> o azido etilendiaminotetrazetikoa                            |
| EE:       | Erretikulu endoplasmatikoa  |
| EMSA:     | <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> o mugimendu elektroforetikoa aldaketa entsegua                |
| ET:       | Proteina erazkin totala   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| FHF:               | <i>Fused Toes (FTS)-Hook-Hook Interacting Protein (FHIP)</i> proteinek osatutako konplexua                            |
| Flb:               | <i>Fluffy, low bristle expression</i> edo akonidiala <i>brlA</i> -ren adierazpen baxuagatik                           |
| FLIP:              | <i>Fluffy in phosphate</i> edo fostatotan fenotipo akonidiala   |
| FOA:               | <i>Fluoroorotic acid</i> edo azido 5-fluororotikoa  |
| gDNA:              | Genomic <i>deoxyribonucleic acid</i> edo azido desoxierribonukleiko genomikoa   |
| GFP:               | <i>Green fluorescence protein</i> edo <i>Aquore victoria</i> medusaren proteina fluoreszente berdea                   |
| GFP1:              | <i>Green fluorescence primer 1</i>  |
| GFP2:              | <i>Green fluorescence primer 2</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> edo glutation-S-transferasa erretxina  |
| h:                 | Orduak  |
| HA <sub>3x</sub> : | <i>Hemagglutinin</i> edo giza gripearean eragile den birusaren hemagglutinaren 98-106 aminoazidoak (3 kopia jarraian) |
| HC:                | <i>Heavy chain</i> edo kate astuna  |
| HEPES:             | <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> edo azido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfonikoa      |
| IC:                | <i>Intermediate chain</i> edo erdibideko katea  |
| IPTG:              | <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> edo isopropil-β-D-tiogalaktopiranosidoa                                  |
| kDa:               | Kilodalton (=1000Da)  |
| LB:                | <i>Luria-Bertani</i>  |
| LC:                | <i>Light chain</i> edo kate arina   |
| LIC:               | <i>Light intermediate chain</i> edo erdibideko kate arina   |
| MCA:               | <i>Aspergillus</i> medio osoa   |
| mCh:               | <i>Monomeric CherryRed Fluorescent Protein</i> o <i>CherryRed</i> proteina fluoreszente monomerikoa                   |
| MFA:               | <i>Aspergillus</i> hartzidura medioa  |

|          |   |
|----------|---|
| min:     | Minutuak  |
| MMA:     | <i>Aspergillus</i> medio minimoa  |
| MMR:     | Birsortze medioa  |
| MMR-TOP: | Birsortze TOP medioa  |
| mRFP:    | <i>Monomeric red fluorescent protein</i> edo <i>Discosoma striata</i> koralaren proteina monomeriko fluoreszente gorria |
| mRNA:    | <i>Messenger ribonucleic acid</i> edo azido ribonukleiko mezularia  |
| MT:      | Mikrotubuluak   |
| MTBD:    | <i>Microtubule binding-domain</i> edo mikrotubuluetara lotzeko eremua   |
| MTOCs:   | <i>Microtubule organizing centers</i> edo mikrotubuluen zentro antolatzailea  |
| NEM:     | <i>N-ethylmaleimide</i> edo N-etilmaleimida   |
| NLS:     | <i>Nuclear Localisation Signal</i> edo nukleo lokalizazio seinalea  |
| NPC:     | <i>Nuclear Pore Complex</i> edo poro nuklearrak   |
| NR:      | <i>No-retained fraction</i> edo erretenitu gabeko frakzioa (immunoprezipitazio entseguetan)                             |
| nt:      | Nukleotidoa   |
| ORF:     | <i>Open reading frame</i> edo irakurtarau irekiko eremua  |
| PBS:     | <i>Phosphate-buffered saline</i> edo fosfato tanpoia  |
| PCR:     | <i>Polymerase chain reaction</i> edo polimerasa kate erreakzioa   |
| PD:      | <i>Pull-down</i> edo erretentzio entseguak  |
| PEG:     | Polietilenglikola   |
| PMT      | <i>O-mannosyltransferase</i> edo O-manosiltransferasa   |
| PP1:     | <i>Promoter primer 1</i>  |
| PP2:     | <i>Promoter primer 2</i>  |
| PVDF:    | <i>Polyvinylidene fluoride</i> edo polibinilideno difluoruro  |
| R:       | <i>Retained fraction</i> edo erretenitutako frakzioa (immunoprezipitazio entseguetan)                                   |
| RGS:     | <i>regulator of G-protein signaling</i>   |
| RNA:     | <i>Ribonucleic acid</i> edo azido erribonukleikoa   |
| RNAse:   | Erribonukleasa  |
| RNA-seq: | <i>RNA sequencing</i> edo RNA sekuentziazio masiboa   |
| rpm:     | <i>Revolutions per minute</i>   |
| s:       | segunduak   |

|        |  |
|--------|--|
| SNARE: | <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor</i> mintz-proteinak |
| SDS:   | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> edo sodio dodecil sulfatoa                             |
| SMP1:  | <i>Selectable marker primer 1</i>  |
| Spk:   | <i>Spitzenkörper</i>   |
| TF:    | Transkripzio faktorea  |
| TCA:   | <i>Trichloroacetic acid</i> edo azido trikloroazetikoa                               |
| TM:    | <i>Transmembrane</i> edo mintz-zeharreko eremua                                      |
| Tris:  | <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> edo tris (hidroximetil)-aminometanoa          |
| UDA:   | <i>Upstream developmental activators</i> edo garapenaren erregulazio aktibatzaileak  |
| UPR:   | <i>Unfolded protein response</i> edo tolestu gabeko proteinen aurkako erantzuna      |
| uORF:  | <i>upstream open reading frame</i> edo 5'-UTR-ko irakurtarau irekiko eremua          |
| UV:    | <i>Ultra violet radiation</i> edo erradiazio ultramorea                              |
| VG:    | <i>Vegetative growth</i> edo hazkuntza begetatiboa                                   |
| WMM:   | <i>Watch minimal medium</i> edo behaketa- medio minimoa                              |
| WT:    | <i>Wild type</i> edo aldaera basatia   |

**Aurkibidea**





## **1. KAPITULUA: SARRERA** **21**

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Esporulazioa biziraute eta zabalpen bektore bezala izaki bizidunetan</b>   | <b>23</b> |
| 1.1. Onddoak ekosistemaren eta gizartearen onura nahiz mehatxu   | 25        |
| <b>2. <i>Aspergillus nidulans</i> eredu organismo gisa</b>   | <b>26</b> |
| 2.1. <i>A. nidulans</i> -en hazkuntza begetatiboa  | 29        |
| 2.1.1. Espora erneketa   | 29        |
| 2.1.2. Hazkuntza polarizatua   | 31        |
| 2.1.3. Endozitosi prozesua eta polaritate jarraituaren gakoak  | 35        |
| 2.1.4. Garraio basipetal edo eretrogradoa  | 37        |
| 2.2. Garapen asexuala  | 39        |
| 2.2.1. Garapen asexualaren kontrol genetiko eta molekularra  | 40        |
| 2.2.1A Bide genetiko zentrala (CDP: <i>Central Developmental Pathway</i> )   | 41        |
| 2.2.1B UDA edo <i>upstream developmental activation</i> bidea  | 44        |
| 2.3. Ugalketa sexuala  | 48        |
| 2.4. Garapen asexualaren erregulatzailer negatiboak hazkuntza eta garapen ziklo asexual nahiz sexualaren arteko bidegurutzetan | 49        |

## **HELBURUAK** **53**

---

## **2. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK** **57**

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Erabilitako anduiak, oligonukleotidoak eta plasmidoak</b>                  | <b>59</b> |
| 1.1. Anduiak   | 59        |
| 1.2. Oligonukleotidoak   | 63        |
| 1.3. Plasmidoak  | 66        |
| <b>2. Hazkuntza baldintza eta <i>Aspergillus nidulans</i>-en kultura medioak</b> | <b>67</b> |
| 2.1. <i>Aspergillus nidulans</i> -en anduien ezaugarritze fenotipikoa            | 71        |
| 2.2. Ernamuintze eta adarkatze azterketak medio likidotan                        | 71        |
| 2.3. Hazkuntza azterketak MMA medio likidotan                                    | 72        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. Esporen kuantifikazioa</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>4. Ausazko mutagenesi prozedura argi ultramoreaz</b> .....                             | <b>73</b> |
| <b>5. <i>Aspergillus nidulans</i>-en protoplastoen lorpena eta transformazioa</b> .....   | <b>74</b> |
| 5.1. Protoplastoen lorpena.....   | 75        |
| 5.2. Protoplastoen transformazioa.....  | 76        |
| 5.3. Azido 5-Fluoroorotikoaz ( <i>FOA</i> ) transformazioa.....                           | 78        |
| 5.4. Genotekaz transformazioa.....  | 78        |
| <b>6. DNA erauzketa eta manipulazioa <i>Aspergillus nidulans</i>-en laginetatik</b> ..... | <b>79</b> |
| 6.1. <i>A. nidulans</i> -en gene delezio eta etiketatzea.....                             | 79        |
| 6.2. Zuzendutako mutagenesia.....   | 82        |
| 6.2.1. F1bE::F1bB kimerak adierazten dituzten <i>A. nidulans</i> -en anduien sorrera..... | 83        |
| 6.3. Gene baten ausazko mutagenesia.....  | 85        |
| 6.4. DNA erauzketa.....   | 85        |
| 6.5. DNA-ren detekzioa zunda luminiszente bidez ( <i>Southern-blot</i> ).....             | 87        |
| <b>7. Genetika klasikoko teknikak</b> .....   | <b>89</b> |
| 7.1. Gurutzapen meiotikoa.....  | 90        |
| 7.2. Diploideen eraketa eta haploidizazioa.....   | 91        |
| 7.2.1. Azpirakortasun test-a.....   | 91        |
| 7.2.2. Haploidizazioa.....  | 92        |
| 7.3. FLIP166-ren mutazioa dagoen kromosomaren identifikazioa analisi genetikoaz.....      | 92        |
| <b>8. Biologia molekularreko teknikak <i>Escherichia coli</i> bakterioaz</b> .....        | <b>93</b> |
| 8.1. <i>E. coli</i> bakterioarentzat hazkuntza media.....                                 | 93        |
| 8.2. <i>E. coli</i> -ren zelula konpetenteen prestaketa.....                              | 94        |
| 8.3. <i>E. coli</i> zelula konpetenteen transformazioa.....                               | 95        |
| 8.4. DNA plasmidikoaren erauzketa.....  | 95        |
| 8.5. Proteina errekonbinanteen adierazpena <i>E. coli</i> -n.....                         | 95        |
| <b>9. <i>Aspergillus nidulans</i> ondoaren proteina erauzketa eta manipulazioa</b> .....  | <b>96</b> |
| 9.1. Proteina erauzketa.....  | 96        |
| 9.1.1. Lisi alkalinoa (1 metodoa).....  | 97        |

|   |            |
|---|------------|
| 9.1.2. Proteina erauzketa luzea (2 metodoa).....  | 97         |
| 9.2. Proteina-proteina erretentzio entseguak ( <i>Pull-Down</i> ).....  | 98         |
| 9.2.1. Proteina-proteina erretentzio esperimentua <i>in vitro</i> .....   | 98         |
| 9.2.2. Proteina-proteina erretentzio esperimentua <i>in vivo</i> .....  | 99         |
| 9.3. Proteinen immunodetekzioa.....   | 100        |
| <b>10. Fluoreszentzia mikroskopia.....</b>  | <b>101</b> |
| <b>11. Baliabide eta azterketa bioinformatikoak.....</b>  | <b>103</b> |
| <br>  |            |
| <b>3. KAPITULUA: FlbB-ren SINTESI MEKANISMOA ETA GARRAIO AKROPETALA</b>   | <b>105</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>1. Sarrera.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>2. Emaitzak.....</b>   | <b>109</b> |
| 2.1. <i>flbB</i> -ren promotoreko uORF-en azterketa.....  | 109        |
| 2.2. FlbB-ren puntarako garraioa FlbE-ren bitartekaritza.....   | 112        |
| 2.2.1. FlbB-ren C727A eta C382A mutazioek FlbE-rekiko interakzioa ahultzen dute baina ez dute guztiz inhibitzen.....                          | 112        |
| 2.2.2. FlbE-ren E1 eremuko W11A mutazioak FlbE eta FlbB arteko interakzioa ahultzen du <i>in vivo pull-down</i> entseguetan.....              | 114        |
| 2.2.3. Behin hifaren puntan, FlbE eta FlbB arteko elkarrekintza inhibitzea beharrezkoa da FlbB nukleora itzuliko bada.....                    | 117        |
| <b>3. Eztabaida.....</b>  | <b>121</b> |
| <br>  |            |
| <b>4. KAPITULUA: FlbB-ren GARRAIO BASIPETALA ETA METAKETA NUKLEARRA <i>brlA</i>-ren TRANSKRIPZIOA ERREGULATU AHAL IZATEKO</b>                 | <b>127</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>1. Sarrera.....</b>  | <b>129</b> |
| <b>2. Emaitzak.....</b>   | <b>130</b> |
| 2.1. FlbB-ren garraio basipetala hifen puntatik nukleora.....   | 130        |
| 2.1.1. KapA, $\alpha$ -inportinaren, ustezko bitartekaritzaren azterketa FlbB-ren punta-nukleo arteko garraioan eta metaketa nuklearrean..... | 130        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.1.1A. NLS eremuko K67A eta R68A mutazioek ez dute $\Delta flbD$ fondo genetikoan FlbB-ren dinamika zitoplasmikoa inhibitzen.....                          | 131        |
| 2.1.1B. $\Delta flbD$ fondo genetikoan <i>kapA31</i> mutazio termosentikorrek ez du, antza, FlbB-ren lokalizazioan eta dinamikan aldaketarik eragiten ..... | 134        |
| 2.1.1C. KapA eta FlbB proteinen artean interakzio genetikoa egon liteke.....  | 136        |
| 2.1.1D. <i>Pull-down</i> entseguetan KapA eta FlbB elkar ahulki erretentitzeko gai dira...  | 137        |
| 2.1.2. <i>nudA1</i> mutazio termosentikorraren eraginpean FlbB-ren metaketa nuklearra inhibitu egiten da.....   | 141        |
| 2.2 FlbD-ren parte-hartzea FlbB-ren metaketa nuklearrean.....   | 143        |
| 2.2.1. FlbD-ren cMyb eremua eta C-terminal ertza ezinbesteko dira FlbB-ren metaketa nuklearrerako.....  | 143        |
| 2.2.1A. FlbD-ren cMyb eremua nahiz C-terminaleko azken aminoazidoak oso kontserbatuta daude FlbD-ren ortologoetan.....                                      | 146        |
| 2.2.1B. FlbD-ren cMyb eremua ezinbesteko da FlbB nukleoetan pilatuko bada, baina ez da nahikoa.....   | 148        |
| 2.2.1C. FlbD-ren C-terminal ertzean aurkitzen den LxxLL eremuko Leu309 eta Leu312 aminoazidoak beharrezkoak dira FlbB nukleoetan meta dadin .....           | 150        |
| 2.2.2. FlbB-ren C-terminal ertzeko Leu330 eta Leu334 aminoazidoak ezinbestekoak dira bere lokalizazio nuklearrerako.....                                    | 151        |
| 2.3 FlbB eta FlbD-k <i>brlA</i> -ren promotorean lotzeko proposatu izan diren ustezko dianen delezioak ez du konidiazioa inhibitzen.....                    | 153        |
| <b>3. Eztabaida.....</b>  | <b>154</b> |
| <br>  |            |
| <b>5. KAPITULUA: FOSFATO IOIEK ERAGINDAKO ESTRESPEAN KONIDIATZEN EZ DUTEN MUTANTEEN ISOLATZEA ETA MUTATUTAKO GENEEN IDENTIFIKAZIO ETA EZAUGARRITZEA</b>     | <b>161</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>1. Sarrera.....</b>  | <b>163</b> |
| <b>2. Emaitzak.....</b>   | <b>164</b> |
| 2.1. FLIP ( <i>Fluffy in phosphate</i> ) mutanteen isolatze eta ezaugarritze fenotipikoa.....   | 164        |
| 2.1.1. Ausazko mutagenesi prozeduraren bidez 81 FLIP mutante isolatu ziren.....   | 164        |
| 2.1.2. FLIP hautagaien ezaugarritze eta sailkatze fenotipikoa.....  | 165        |
| 2.1.2A FLIP mutanteen ezaugarritze fenotipikoa medio desberdinetan.....   | 166        |
| 2.1.2B FLIP33 eta FLIP104 hautagaiek ez dute mutaziorik <i>flbD</i> genean.....   | 169        |
| 2.2. FLIP166 fenotipoaren erantzule den mutazioaren identifikazioa.....   | 170        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.2.1. FLIP16 eta FLIP166 fenotipoen erantzule diren mutazioak azpirakorrak dira.....   | 170        |
| 2.2.2. <i>AN8501/socA</i> -ren neurritz gaindiko adierazpenak FLIP166-ren fenotipo akonidiala ezabatzen du: FLIP166-ren protoplastoen transformazioa genotekaz..... | 171        |
| 2.2.2A T15 transformante errebertienteak <i>AN8501</i> geneari zegokion plasmidoa zeraman.....  | 173        |
| 2.2.2B FLIP166 fenotipo akonidiala ez da <i>AN8501</i> genea mutatzearen ondorio baina, bere gain-adierazpenak FLIP166 fenotipoa lehenarazten du.....               | 174        |
| 2.2.2C SocA-ren ezaugarri funtzionala.....  | 176        |
| 2.2.3. PmtC proteinaren P282L mutazio puntualak eragin du FLIP166 fenotipoa.....  | 180        |
| 2.2.3A FLIP166-ren genomaren sekuentziazioa.....  | 180        |
| 2.2.3B PmtC <sup>P282L</sup> mutazioaren identifikazioa FLIP166 fenotipoaren erantzule gisa.....  | 182        |
| 2.2.3C PmtC-ren C-ertza funtsezko da konidiaziorako baina, ez hazkuntzarako.....  | 185        |
| 2.2.3D PmtC proteinen O-manosiltransferasaren azterketa bioinformatikoa.....  | 187        |
| 2.2.3E P282L mutazioak ez du aldatzen PmtC-ren lokalizazio subzelularra.....  | 190        |
| <b>3. Eztabaida.....</b>  | <b>193</b> |
| <br>  |            |
| <b>6. KAPITULUA: EZTABAIDA OROKORRA.....</b>  | <b>199</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>1. FlbB TF-aren dinamika eta jardute mekanismoa <i>brlA</i>-ren erregulaziorako.....</b>   | <b>201</b> |
| 1.1. FlbB-ren puntaranzko garraio akropetala FlbE-rekin batera.....   | 201        |
| 1.1.1. FlbB eta FlbE konplexuaren dinamika puntaranzko bidean.....  | 202        |
| 1.1.2. FlbB eta FlbE konplexuaren konformazioa.....   | 204        |
| 1.2. FlbB-ren garraio basipetala eta nukleoetan barneratzea.....  | 206        |
| 1.3. FlbB eta FlbD-ren bitarteko <i>brlA</i> -ren adierazpenaren erregulazioa.....  | 219        |
| <br>  |            |
| <b>2. Konidiazioaren indukzioan hainbat faktorek eta bide genetikoek hartzen dute parte.....</b>  | <b>223</b> |
| <br>  |            |
| <b>ONDORIOAK.....</b>   | <b>227</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>231</b> |

**7. KAPITULUA: ERANSKINAK****251**

---

|                     |     |
|---------------------|-----|
| 3.1. Eranskina..... | 253 |
| 3.2. Eranskina..... | 254 |
| 4.1. Eranskina..... | 255 |
| 4.2. Eranskina..... | 256 |
| 5.1. Eranskina..... | 257 |
| 5.2. Eranskina..... | 258 |
| 5.3. Eranskina..... | 263 |
| 5.4. Eranskina..... | 264 |
| 5.5. Eranskina..... | 265 |
| 5.6. Eranskina..... | 274 |

**8. KAPITULUA: ARTIKULUAK****275**

---

**1.KAPITULUA:**  
**Sarrera**





## 1. Esporulazioa biziraute eta zabalpen bektore bezala izaki bizidunetan.

Esporen ekoizpena ingurune desberdinetara zabaltzeko eta baldintza gogorretan bizirauteko estrategia oso zabaldua da hainbat izaki bizidunen artean. Onddo, alga, landare, protozoo eta bakterioek, esporulazio molde desberdinak izanik ere, inguru baldintza berrietara egokitzeko mekanismo hau garatu dute, baldintza egokiak agertu eta hazkuntzari bide eman artean bizirauteko aukera eskaintzen diena (Huang eta Hull, 2017). Esporak metabolikoki inaktiboak izateagatik, estres baldintzekiko erresistenteak izateagatik eta baldintza egokien aurrean ernetzeko gaitasunagatik ezaugarritzen dira (Huang eta Hull, 2017). Hain zuzen, esporak baldintza bortitzak jasateko gai dira denbora luzean, hala nola, temperatura altu nahiz baxuak, hezetasun maila baxuak, UV erradiazioa eta hainbat konposatu kimikoren eragina jasan ditzakete hein batean (Setlow, 2014a). Ezagutzen diren espora bideragarri zaharrenak, bakterio esporak, duela 250 milioi urtekoak dira eta gatz kristaletan txertatuta topatu ziren (Vreeland *et al.*, 2000). Onddoen kasuan ere, ehunka mila urteko esporak aurkitu dira ozeano sedimentuetan eta izotz artikoan (Damare eta Raghukumar, 2008; D'Elia *et al.*, 2008). Honek guztiak, ebolutiboki oso primitiboa den mekanismo biologiko baten aurrean gaudela iradokitzen du.

Esporek denbora luzean iraun dezaten ezinbesteko estrategia dute sorgorraldia edo metabolismoaren aktibitate baxua. Sorgorraldi hau kanpo baldintzek, ur edo elikagai agorpenak bultzatzen ditu. Sorgorraldi konstitutiboan, barne baldintzek kontrolatu ohi dutena, dihardute adibidez auto-inhibitzaile nahiz metabolismoa blokeatu dezaketen faktoreak. Bestalde, pareta zelular edo zitosolak sorgorraldia eusten lagun dezakete elikagaien sarrera oztopatzeaz (Wyatt *et al.*, 2013). Aldi berean, biziraute estrategia aproposa izateko, esporek gai izan behar dute inguru-giro baldintzak egokiak direnean erneketa ahalbidetzeko eta hazkuntza berrabiarazteko. Esporen biologia eta erneketa bereziki aztertuak izan dira bakterioengan (Setlow, 2014b), alabaina protisten eta onddoen esporak ere maiz aztergai izan dira (Dantigny eta Nanguy, 2009). Hain zuzen, onddoak dira espora gehien ekoizten duen erreinua. Biziraupenerako

## 1. KAPITULUA:

---

lehentasunezko mekanismoa izaki, onddoek bide genetiko konplexuak garatu dituzte esporak ekoizteko eta haien zabalkundea bermatzeko (Huang eta Hull, 2017). Helburu orokorra hau izan arren, ekoizpen mekanismoak, morfologiak, eta abar, oso anitzak dira erreinuko espezieen artean. Horrela, esporak meiosiz nahiz mitosiz sortuak izan daitezke, haploide, diploide edo nukleoaniztunak, aska izeneko zorrotan bilduta egon daitezke, katean ala bakarka sortuak. Ezaugarri eta morfologia posibleen aniztasun handi honek konbergentzia ebolutiboaren ideia azpimarratzen du (Gabora, 2013). Alegia, espezieen mekanismo genetikoaren artean dauden ezberdintasunek morfologia desberdineko egiturak (esporak) sortzera daramate baina, guztiek dute helburu bera: leku berrietara barreiatu eta baldintza bortitzen pean bizirautea (Nagy *et al.*, 2018; Etxebeste *et al.*, 2019).

Esan bezala, bizirauteko mekanismo izateaz haratago, zabalkunde bektore garrantzitsua dira esporak. Izan ere, haizea, ur-korrante eta bestelako organismoen bitartez inguru edo nitxo ekologiko berrietara garraiatuak izan daitezke. Horrela, mekanismo fisikoez gain, ezagunak dira, besteak beste, zenbait onddoren, bereziki onddo patogenoen, garraioan diharduten hegazti eta intsektuen adibideak (Wyatt *et al.*, 2013; Golan eta Pringle, 2017). Pertsonak ere dispertsio bektore garrantzitsua gara, pertsonen bitarteko kontinente-arteko onddo patogenoen esporen garraioa infekzio transmisio-kate berrien abiapuntu garrantzitsu izan daiteke eta (Fisher *et al.*, 2012).

Biziraupena, ugalketa eta dispertsioa izanik helburu nagusiak, azkartasuna litzateke onddoen esporen ekoizpenak eduki beharko lukeen ezaugarri nagusietako bat. Testuinguru honetan, esporak mitosi bidez (asexualki) meiosi bidez (sexualki) baino azkarrago ekoizten dira, eta barreiatzen ere errazagoak dira (Wyatt *et al.*, 2013). Horregatik, dispertsioa helburu denean garapen asexuala sexualarekiko nagusitzen da (ikus bi ugalketa mekanismoak lan honetan erabiliko den erreferentzia sisteman sarrera honetako 2.2 eta 2.3 ataletan). Alabaina, espora sexualak garatzea prozesu luzeagoa izan arren, meiosi prozesua oinarri izanda, aldakortasun

genetikoa ahalbidetzen du, ingurura egokitzeko gaitasun handiagoa emanaz (McDonald *et al.*, 2016). Bi prozesuak aukerabide izateak egokitze eta zabaltze gaitasunak konbinatzen ditu. Onddoak aurkitzen den ingurugiro baldintzek eragingo dute hazten jarraitu edo ugalketa-bide bat edo bestea aktibatzea.

### 1.1. Onddoak ekosistemaren eta gizartearen onura nahiz mehatxu.

Onddoen esporen zabalpen masiboak uste baino eragin nabariagoa du ekosisteman eta gure gizartean. Batetik, eta aurrez aipatu bezala, infekzio gaitasunean esporek duten garrantzia dago. Izan ere, ingurura zabaltzeko eta egokitzeko gaitasun handiak, agente patogeno garrantzitsu bilakatzen dituzte onddoen esporak (Fisher *et al.*, 2020). Bestetik baina, onddoak ezinbesteko rola jokatzen dute ekosisteman, materia organikoaren deskonposizioan duten funtzioagatik (Treseder eta Lennon, 2015; Gadd, 2017). Bestalde, zenbait onura ere eskaintzen digute. Adibidez, historikoki onddoak elikagaien ekoizpenean erabili eta erabiltzen dira (Johnson, 2016). Egun balio handiko hainbat produktu bioteknologiko lortzeko ere baliatzen dira; besteak beste, konposatu organiko, bitamina, entzima edo antibiotikoak (Archer *et al.*, 2008). Hain zuzen, sektore farmakologikoan leku garrantzitsua dute, antibiotikoekin batera, immunosupresoreen ekoizpena dela eta (Chambergo eta Valencia, 2016).

Bioaniztasunaren gaineko mehatxuari dagokionez, patogenoen ostalari izan daitezkeen landare nahiz animalien mehatxu nagusietako bat dira onddoak. Patogenoek eraginda hiltzen diren ostalarien %65-a onddoek sortutako infekzioengatik dela kalkulatu da (Fisher *et al.*, 2012). Patogeno baten populazioa honen ostalariarenaren menpekoa dela ulertu izan ohi da. Alegia, patogenoak bizirauteko ostalaria behar badu, lehena ez da sekula ostalaria desagerraraztera helduko (De Castro eta Bolker, 2005). Alabaina, esporen ekoizpen masiboa dela eta, onddoek ostalariaren desagertzea eragin lezaketela proposatzera iritsi da zenbait zientzialari (Fisher *et al.*, 2012).

## 1. KAPITULUA:

---

Nekazaritzan onddoek nahiz oomizetoek galera garrantzitsuak eragiten dituzte pertsonon elikagai iturri nagusi diren uzta laboreetan (arroza, garia, artoa, palma olio eta soja). Mundu osoan, laborantzako eta uzta-ondorengo galerak %20 eta %10 ingurukoak direla kalkulatu da, hurrenez hurren (Fisher *et al.*, 2018). Landare patogeno ugariak ere (Dean *et al.*, 2012), elikagaien segurtasuna mehatxatzen dute mundu mailan, mikotoxinen ekoizpena dela eta (Alshannaq eta Yu, 2017).

Onddoek pertsonon osasuna ere arriskuan jar dezakete. Ohiko azal, azazkal edo mukosa infekzioez gain (mundu mailako populazioaren ~%25-ari eragiten die), onddo infekzio inbaditzaileek urtero milioi eta erdi pertsona hiltzen dituztela kalkulatu da (Brown *et al.*, 2012). Oro har, heriotza horietatik gehienak onddo oportunistek immunoeskasia duten pertsonengan eragindakoak dira (Fisher *et al.*, 2020). *Aspergillus* generoko espezieen ondorioz, kasu, urtero 300 mila pertsona inguruk aspergilosia deritzon infekzioa garatzen du (Fisher *et al.*, 2020). Normalean, aspergilosia onddo hauen esporea asexualen (konidio izenarekin ezagutzen direnak) inhalazioz sortu ohi da. Pertsona osasuntsuen neutrofilo eta makrofagoek inhalatutako konidioak fagozitatzen dituzte, baina immunitate arazoak izanez gero konidioak ernatu eta inguruko ehunen erasoaz mikosia abia daiteke (Pemán eta Quindós, 2014).

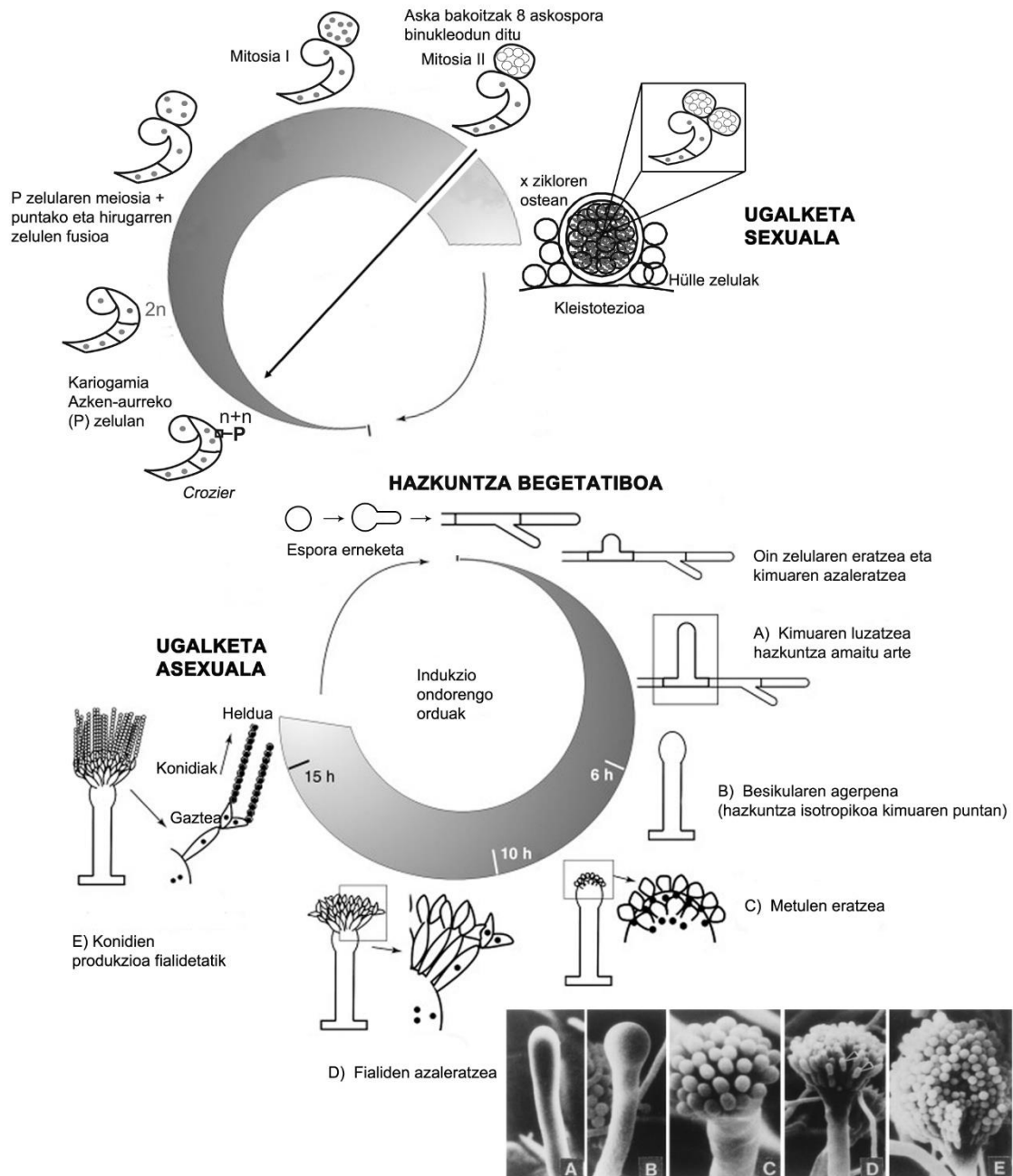
## 2. *Aspergillus nidulans* eredu organismo gisa.

*Aspergillus* generoa 300 espezie inguruz osatua dagoela kalkulatu da (Samson *et al.*, 2014). Genero hau Askomizetoen filum-ean kokatzen da, Eurotiomizetoen klasean eta Eurotiales ordenean, zehazkiago Trichocomaceae familian. Onddoetan eta bereziki harizpi itxurako onddoen artean (ikus aurrerago) gehien aztertutako generoetako bat da (Scazzocchio, 2009), bere baitan garrantzia handia duten espezieak baitaude medikuntza (*A. fumigatus*, *A. terreus*), elikadura (*A. flavus*, *A. parasiticus*) edo industria (*A. niger*, *A. oryzae*) bezalako alorretan. Eredu organismo bezala ere oso erabiliak dira *Aspergillus* generoko espezieak, hainbat prozesu zelular

aztertzeko. *Aspergillus nidulans* espeziea, besteren artean, sarritan baliatu da ziklo zelularra, hazkuntza polarizatua, estresaren aurreko erantzuna edo ugalketaren (sexuala nahiz asexuala) kontrol genetikoaren azterketan (Etxebeste eta Espeso, 2020). Laborategian eredu organismo honen erabilerak 1950-eko hamarkadara garamatza (Pontecorvo *et al.*, 1953). Mende honen hasieran, bestetik, bere genomaren lehen sekuentziazioak ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org); (Galagan *et al.*, 2005)) bultzada handia eman zion organismo honen biologia molekularrari. Egun A. *nidulans*-en genomaren sekuentzia eta beste tresna bioinformatiko ugari eskuragarri daude FungiDB (Fungal and Oosmycete Genomics Resources; [fungidb.org/fungidb/](http://fungidb.org/fungidb/)) bezalako datu baseetan. Patogeno bezala edo industriari interes zuzenik izan ez arren, oinarritzko ikerketan eredu gisa presentzia handiko espeziea da A. *nidulans*, zelula eukariotikoen biologia eta prozesu molekularren ezagutzan izan duen ekarpenagatik. Bere hazkuntza eta ugalketa zikloak (ikus hurrengo sekzioetan) oso errez eragiten dira laborategi mailan eta, gainera, genero bereko beste espezieekiko gertutasun ebolutiboak A. *nidulans* erabiliz garatutako jakintza estrapolagarria egiten du intereseko espezie horiekiko.

A. *nidulans*-en bizitza-zikloa lau fase desberdinek osatzen eta ezaugarritzen dute: hazte begetatiboa, ugalketa asexuala, ugalketa sexuala eta ziklo parasexuala (1.1. irudia). Onddoaren hazte fasea, jarraian azalduko den bezala, hifa izeneko egitura tubularren garapenak eta hauen hazkuntza polarizatuak ezaugarritzen dute. Hifa hauek garapenerako "heldutasuna" edo gaitasuna eskuratzean, eta beti ere inguruko baldintzen baitan, hazkuntza polarizatua eten eta asexualki edo sexualki ugaltzeko gai dira. Zenbait lanek, garapen asexuala edo sexuala aktibatzeke heldutasun edo gaitasun hori hazkuntza hasi eta 18 eta 24 ordu ingurura gauzatzen zela proposatu zuten, hurrenez hurren (Axelrod *et al.*, 1973; Noble eta Andrianopoulos, 2013). Ondorengo lerroetan fase horiek azalduko badira ere, doktorego tesi honetan garapen asexuala izango da ardatz nagusia, konidioen ekoizpena maila genetiko eta molekularrean nola zuzentzen den ulertzeko bidean mugarri berriak bilatzeko helburuaz.

# 1. KAPITULUA:



**1.1. irudia: *A. nidulans* onddoaren ugalketa zikloen irudikapena.** Irudiaren erdigunean hazkuntza begetatiboa laburtzen da, esporen erneketa eta hifen hazkuntza polarizatu irudikatzen direlarik bertan (ikus 2.1. atala Sarrera honetan). Behealdean, ugalketa asexuala eta konidioforo izeneko egitura asexualen eraketa posible egiten duten aldaketa morfologikoak biltzen dira, garapen asexuala induzitu eta ordu desberdinetara. Konidioforoek konidio, edo espora asexualen, ekoizpena posible egiten dute eta eustoin gisa ere dihardute. Behean eskuinetara, konidioforo baten eraketa urratsen mikroskopia bidezko irudiak erakusten dira (Mims *et al.*, 1988). Goialdeko eskeman onddoaren ugalketa sexuala burutzeko eman beharreko urratsak laburbiltzen dira, non kleistotezio izeneko egitura sexual konplexuak osatzen diren, bakoitzak milaka askospora edo espora sexual dituelarik. Irudi hau (Etxebeste *et al.*, 2010a; (Etxebeste *et al.*, 2010b eta Mims *et al.*, 1988) lanetan argitaratutako irudiak oinarri hartuta moldatu da.

## 2.1. *A. nidulans*-en hazkuntza begetatiboa.

### 2.1.1. Espora erneketa.

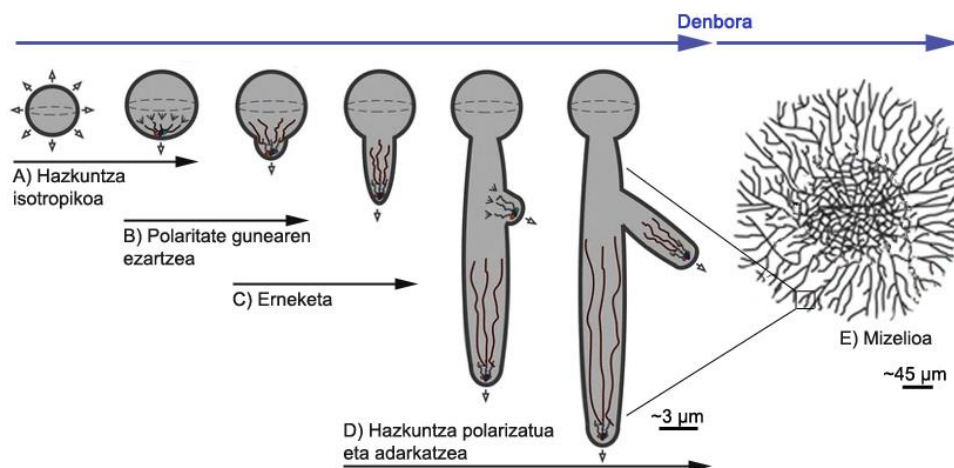
Esporaren, konidiosporen (ugalketa asexualeko espora mitotikoak) edo askosporen (ugalketa sexualeko espora meiotikoak), ernetzeaz abiatzen da *A. nidulans*-en bizi zikloa. Aurrez azaldu den bezala espora asexualak, konidioak, bizi-iraute eta zabaltze mekanismo nagusia dira ondo honentzat ere. Konidioak baldintza gogorrek jasateko diseinatuta daude, hainbat osagai babesleez osatuta daudelarik horretarako (Baltussen *et al.*, 2020). Besteak beste, *A. nidulans*-en konidioetan kontzentrazio altuetan aurkitzen den trehalosa disakaridoa konidioen iraupen luzerako babesean dihardu (Fillinger *et al.*, 2001); aldiz, erneketa ahalbidetzeko degradatu egiten da.

Kanpo estimulu egokiek konidioa bere sorgorralditik atera eta erneketa eragin dezakete. *A. nidulans*-en kasuan glukosaren presentzia nahikoa izan daiteke erneketa abiarazteko (Osherov eta May, 2000). Hain zuzen, glukosaren seinalizazioan diharduten G-proteina heterotrimerikoaren transdukzio bidea, nahiz honek erregulatzen duen cAMP-PKA seinalizazio bidea, bai eta Ras bideak konidioen erneketan hartzen dute parte (Baltussen *et al.*, 2020). G-proteina heterotrimerikoa osatzen duten subnitateak, GanB ( $G\alpha$  subnitatea), SfaD ( $G\beta$ ) eta GpgA ( $G\gamma$ ), beharrezkoak dira ernetze egokirako, artean baita trehalosa bera degradatzeko ere (Lafon *et al.*, 2005). GanB-k glukosaren aurrean cAMP-PKA bidea aktibatzea funtsezko pausoa da, SfaD eta GpgA subnitateak beharrezkoak direlarik lehenaren aktibazioa erregulatzeko (Lafon *et al.*, 2005). Bestalde, Ras bideari dagokionez, karbono iturri egokiaz aktibatzen den RasA-k puztutako konidioaren hazkuntza isotropikotik (ikus jarraian) hazkuntza polarizaturako trantsizioa kontrolatzen dihardu (Osherov eta May, 2000; Baltussen *et al.*, 2020).

Erneketa bera abiatu baino lehen, zelula barruko presio osmotikoa igo egiten da, eta ura xurgatzeaz konidioak puztu egiten dira (Baltussen *et al.*, 2020). Lehen fase honetan konidioa isotropikoki hazten da (1.2. irudian, A). Pareta zelularra eta mintz plasmatikoa zabaltzeko

## 1. KAPITULUA:

materiala azalera guztian barreiatzen denez, modu uniformean hazten da, alegia. Jarraian baina, eta ezezagunak diren mekanismoak direla medio, puztutako konidioan polaritate puntu bat ezartzen da, eta zelularen hazkuntza norabide honetan zuzentzen da (1.2. irudian, B). Honi esker germinula edo ernamuintze hodia delakoa osatuko da. Hau, era berean, esporaren diametroa adineko luzera duenean jotzen da ernamuintze hoditzat (1.2. irudian, C) (Momany, 2002; Baltussen *et al.*, 2020). Germinulak hazi ahala, harizpi itxurako onddoen ezaugarri diren hifa begetatiboak osatuko dituzte. Hifa deritzen morfologia tubularreko egitura hauek polarizazioz hazten dira, norantza jakin batean (Harris, 2011). Hifan hazkuntza ematen den guneari hifaren punta deritzo. Beraz, polarizazio gunea edo punta hifa baten estentsioa ematen den eremua litzateke. *A. nidulans*-en hifak egitura nukleoanitzak dira. Denborarekin septo edo paretak eratuko dira hifen barnean, zelula desberdinak banatuz. Septo zaharrenak guztiz ixten dira, berrienak irekita mantentzen diren bitartean, alde batetik besterako biomolekulen garraioa ahalbidetuz (Bleichrodt *et al.*, 2015). Bestalde, hifek ere hazte gune berriak eratzen dituzte, eta horietatik adar berriak sortzen dira (1.2. irudian, D) (Momany, 2002). Adar horiek elkar fusioa daitezke anastomosis izena duen prozesuaz (Glass *et al.*, 2004), hifen hazkuntza, adarkatze nahiz fusioa koordinatuz mizelio deritzon sare konplexua osatzen delarik (1.2. irudian, E).



**1.2. irudia: *A. nidulans* onddoaren erneketa eta hazkuntzaren irudikapena.** Esporak lehenik isotropikoki hazten dira polaritate gune bat ezartzen den artean. Polaritate puntu honetatik germinula edo ernamuintze hodia erretzen hasten da, eta honen puntaren hazkuntzaz hifa egitura tubularra haziko da. Hifaren baitan polaritate gune berriek hifen adarkatzeari bide emango diote. Hifen adarkatzeaz gain, hifen puntak elkar fusionatu daitezke mizelio deritzan sare egitura osatuaz. Irudia, (Oartzabal-Arano *et al.*, 2016) lanetik hartutako irudi baten moldaketa da.



### 2.1.2. Hazkuntza polarizatua.

Hifen hazkuntzak onddoari inguruarekin interakzionatzeko aukera ematen dio; besteak beste, substratu berrien kolonizazioa, elikagaien eskuratzea, entzimen jariatzea eta ingurugiroko estimuluaren antzematea burutuz (Sanati Nezhad eta Geitmann, 2013). Harizpi itxurako onddoak ezaugarritzen dituena, hain zuzen, hazkuntza hiperpolarizatua da, hifen puntaren luzatzea, alegia. Puntaren elongazioa gauzatzeko baina, puntara gehituko diren mintz-plasmatico eta pareta zelularreko material berriak, zein hauek lotzeko makineria guztia, eremu honetaraino garraiatu behar dira. Prozesu hau jariatzen besikulen etengabeko fluxuari eta hauen exozitosiari esker burutzen da. Besikula hauetan mintz plasmaticoaren eta pareta zelularra osatzen duten karbohidrato, lipido eta proteinez gain, horien prozesaketarako beharrezko diren entzimak ere garraiatzen dira. Behin puntan, besikulak mintz plasmaticoaz fusionatuko dira garraiatutako kargoak puntara gehituz eta beste osagai batzuk ingurune estrazelularrera jariatuz (Riquelme *et al.*, 2018). Trafiko besikular hau mikrotubulu eta aktina zitoeskeletoen, dagozkien proteina motorren eta beste hainbat proteina gehiagoren menpe dago. Garraio mekanismoek, bada, berebiziko garrantzia hartzen dute hazkuntza begetatiboan (ikus 1.3. irudia).

Besikulen trafiko honen lehen abiapuntua erretikulu endoplasmatico (EE) da. Zelula eukariotikoetan EE, zentro biosintetiko nagusia izaki, zelularen osagai ugariaren jatorri da (Barlowe eta Miller, 2013). Hainbat proteinen sintesian dihardu, bai eta lipido-geruza bikoitzaren osagai lipidikoenean ere. EE-ren alde zitoplasmaticoan dauden erribosomatan sortutako proteinak translokoi izeneko konplexuaren bitartez EE-ren lumen aldera translokatzeari gain (Zimmermann *et al.*, 2011), euren tolestea, kalitate-kontrola nahiz itzulpen ondorengo hainbat aldaketa burutzen dira bertan. Besteak beste, proteinen glikosilazio prozesuak EE-an hasten dira (Barlowe eta Miller, 2013).

Puntara garraiatu beharreko produktuak Golgiren aparatura pasako dira jarraian, EE-n abiatutako sintesi-prozesuaz jarraitzeko eta helmuga duten zelulako gunera bideratzeko (Munro, 2011). Besteak beste, proteinen glikosilazio espezifikoak bai eta glikolipidoen ekoizpena

## 1. KAPITULUA:

---

Golgiren aparatuan osatzen dira (Munro, 2011). EE-tik Golgira kargoak, COPII (*Coat Protein Complex*) estalduraz osatutako besikuletan ailegatzten dira, alderantzizko noranzkoan COPI-k diharduelarik (Duden, 2003). EE-tik gain, Golgiren aparatua, mintz plasmatikotik nahiz lisosometatik ere iristen dira kargoak. Hori dela eta, Golgi exozitosi eta endozitosi prozesuen bidegurutzetat onartzen da (Mironov eta Pavelka, 2008; Pantazopoulou, 2016).

A. *nidulans*-en hifatan EE eta Golgiren aparatua polarizatuta aurkitzen dira. EE-ren kasuan bi eremu bereizten dira: nukleo ingurukoa, nukleo-estaldura moduan, eta EE “periferikoa”, nukleo apikala (puntatik gertuenekoa) eta endozitosi gune (ikus 2.2.2A atala) artean kokatzen dena (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013; ikus 1.3. irudia ere). Golgiren aparatua kasuan, hau EE eta ia exozitosi gune edo apizearen arteko eremuan kokatzen da (Pantazopoulou eta Peñalva, 2009). Golgiren aparatua baitan kargoen garraioa nola ematen den urtetan eztabaidatu da, eta oraindik ere ezbaian izan arren, egun “zisternen heltzea” ereduaz azaltzen da. Eredu honen arabera, *cis* aldeko Golgiren zisternak (EE-tik gertueneko alde) EE-tik eratorriak dira eta zisterna horiek heldu ahala *trans* aldera mugitzen dira (Glick eta Nakano, 2009). Golgiren aparatutik kanporatuko diren produktuak, edo kargoak, sailkatu eta besikuletan paketatzen dira *trans* aldean, dagokien lekura garraiatuak izan daitezten. Besikula horiei dagokien konpartimenturako garraio erregulazioan dihardute Rab familiako GTPasa proteinek, helburuko konpartimendu hartzailea ezagutzeko gai direlarik. Besikula emaile eta hartzailearen baitan Rab proteina desberdinak bereizten dira. Esaterako, A. *nidulans* onddoan Golgi eremutik apizerainoko besikulen garraioan RabE-k dihardu (Pantazopoulou *et al.*, 2014).

Aurrez esan bezala, besikulek puntarako bidea mikrotubulu eta aktina-harizpietan zehar burutzen dute. MT-ak distantzia luzeko garraioaz arduratzen diren artean, aktinazko harizpietan zehar gauzatzen da exozitosirako azken garraio tarte (1.3. irudia) (Fischer *et al.*, 2008; Riquelme *et al.*, 2018). Besikulen garraioaz gainera, MT-ek nukleoen eta bestelako organuluen distribuzioan bai eta mitosian ere badihardute (Xiang *et al.*, 1994; Xiang eta Fischer, 2004).

Lehenik MT-tan barrena garraiatzen dira besikulak. MT-ak hifen morfologia, hazkuntza polarizatuaren noranzko eta abiadura egokirako ezinbestekoak dira (Horio eta Oakley, 2004; Horio, 2007; Riquelme, 2013). MT-ak  $\alpha$ -tubulinak eta  $\beta$ -tubulinak osatzen dituzten dimeroak polimerizatzean osatzen dira, zilindro itxurako egituraren azalera kateatzen direlarik dimero horiek. MT guztiak zentro antolatzailea deritzon hasiera-gunetik (MTOC, *microtubule organizing centre*) polimerizatzen dira (Fischer *et al.*, 2008). MTOC hauek gune finkoak dira eta MT-en minus ertzak definitzen dituzte. *A. nidulans*-en kasuan, MTOC gune hauek nukleo inguruetatik ez ezik, septuetan ere aurki daitezke. MT-en minus ertzaren kontrakoa da plus ertza, zeinetan hazkuntza edo polimerizazioa baina, baita despolimerizazioa ere gerta daitekeen. Orokorrean, *A. nidulans*-en hifatan, plus ertza hifaren hazkuntza norantzan luzatzen da, puntarantz zuzentzen direlarik baina, orokorrean, apizeraino iritsi gabe eta subapizearen (ikus hurrengo sekzioa) parean geldituz (Fischer *et al.*, 2008; Riquelme *et al.*, 2018). Edonola, MT-n gainean kargoen garraioa eman dadin beharrezko da proteina motorren bitartekaritza. Plus-ertzaren noranzkoan (puntaranzko garraioa edo garraio akropetala) kinesinek diharduten artean, aurkako noranzkoan, minus-ertzerantz (garraio basipetala edo retrogradoa), dineinak esku hartzen du. Harizpi itxurako onddoetan 10-12 kinesina desberdin (familia desberdinetan sailkatuak) aurkitzen diren artean, dineina zitoplasmatico proteina motor bakarra ezagutzen da (Vale, 2003; Steinberg, 2011). Kasu honetan, besikulen puntaranzko garraioan kinesina-1-k, KinA-k, diharduela proposatzen da (Peñalva *et al.*, 2017).

MT-ak, baina, ez dira nahikoak kargoak apizera iristeko, horietan zehar gune subapikalera arteko garraioa burutzen baita. Bada, azken tartea osatzeko eta hazkuntza polarizatuari bide emateko aktina harizpiak ezinbestekoak dira (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Aurrerago aipatuko den bezala, aktinazko harizpiez gain aktinaz osatutako egitura gehiago aurkitzen dira, onddoaren hazkuntzarako ezinbestekoak direnak horiek ere (Berepiki *et al.*, 2011). Aktina-harizpi edo piruei dagokienez, hauek SepA formina (Sharpless eta Harris, 2002) abiapuntu hartuta luzatzen dira (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Bergs *et al.*, 2016) gune subapikaletik

## 1. KAPITULUA:

---

puntaren apize bertaraino. Aktina-harizpien gaineko besikulen garraioaz MyoE miosina arduratzen da, apizeko mintz plasmatikoa eta pareta zelularrarekin fusionatu arte (1.3. irudia) (Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Pantazopoulou *et al.*, 2014).

Laburra izan arren, aktina-harizpi bidezko garraio tarte hau uste baino konplexuagoa da. Besikulak mintz plasmatikoaz fusionatu baino lehen, *Spitzenkörper* deritzon gune subapikalera ailegatzen dira (1.3. irudia). *Spitzenkörper*-a, besikula, aktina, erribosoma, material ezezagun amorfoz eta hainbat proteina konplexuz osatuta dago; eta hifen morfologia eta elongazio noranzkoa zuzentzen ditu (Harris *et al.*, 2005; Riquelme, 2013). *Spitzenkörper*-ak besikula hornitzaile gisa dihardu, bertan pilatu eta mintzaz fusionatzera bideratuko direnen fluxua erregulatuz (Bartnicki-García, 2002).

Kargoen exozitosia hifa puntan gune espezifikotan gauzatzen da (Taheri-Talesh *et al.*, 2008), puntaren elongazio azkarra (baina, ez-jarraia; ikus hurrengo sekzioa; ikus ere Takeshita *et al.*, 2017) aurrera eramateko. Mintz plasmatikoaz besikulen fusioa ahalbidetzeko hainbat elementuk hartzen du parte. Aurrez aipatu bezala, besikula-estalduren osagai den RabE proteinak, MT eta aktina-harizpien gaineko garraioa ahalbidetzeaz gain, mintz plasmatikoaren errekonozimenduan eta fusioan laguntzen du (Pantazopoulou *et al.*, 2014). Behin besikulak mintz plasmatikora behar beste gerturatzean exozisto konplexu oktamerikoaren bidez mintzera ainguratu ohi dira. Harizpi itxurako onddoen hainbat espezetan identifikatu eta ezaugarritu dira exozisto konplexuaren hainbat subunitate (ikus Riquelme, 2013, laneko erreferentziak). *A. nidulans* onddoan, *Saccharomyces cerevisiae*-ren Sec3p subunitatearen homologo den SecC proteina puntan apizeko eremu mugatu batean detektatu zuten (Taheri-Talesh *et al.*, 2008); proteina horien kontserbazio altua dela eta, exozitosia gune jakin horretan ematen zela proposatzera eraman zituen, hain zuzen. Ainguratutako besikulen fusioan SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*) mintz-proteinek hartzen dute parte. v-SNARE (besikuletan aurkitzen dena) eta t-SNARE (“target” besikularen mintz-hartzailea) proteinak elkarren osagarri diren mintz-proteinak dira eta konplexu bat osatzen dute fusioa

ahalbidetzeko. *A. nidulans* onddoan SsoA (t-SNARE) eta SynA (v-SNARE) proteinak identifikatu eta ezaugarritu dira (Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Bai SsoA bai SynA hifen apizean kokatzen dira, lehena ere hifen azalera zehar, modu ez-jarraian, *patch* moduan, detektatu daitekeelarik.

### 2.1.3. Endozitosi prozesua eta polaritate ez-jarraiaren gakoak.

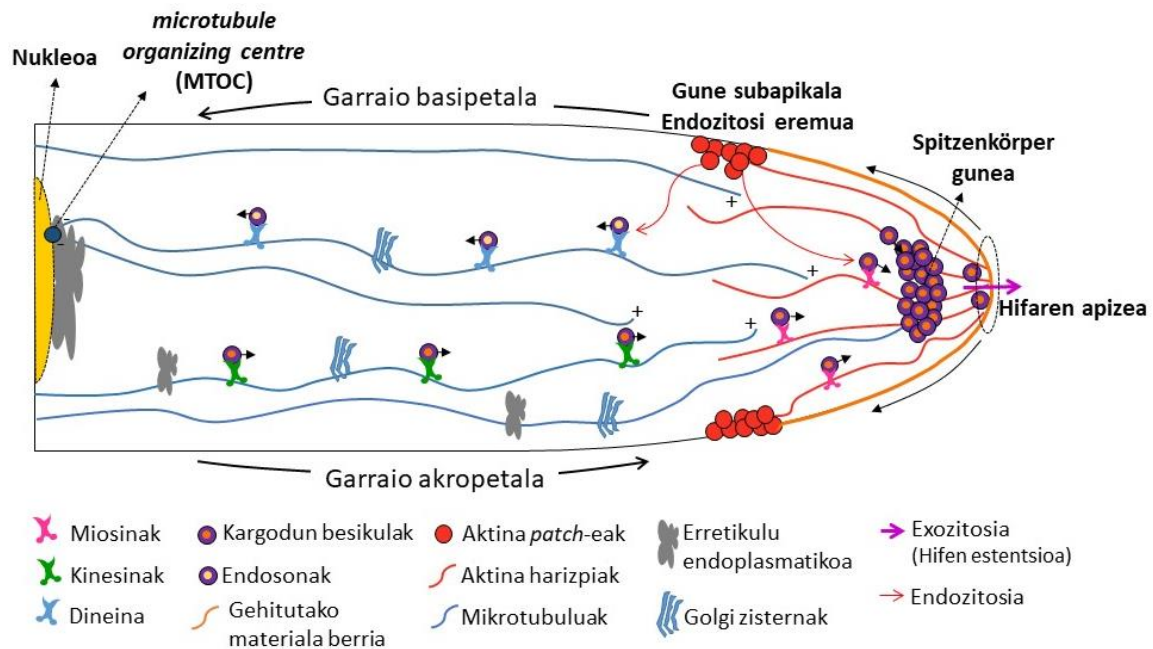
Hifen puntak luzatzeko behar dena baino material gehiago iristen da apizera exozitosiaren bitartez. Pilatutako material soberakin hori endozitosiz barneratzen da, berriro erabili ahal izateko berreskuratua edo, ostera, degradatua izan dadin (Riquelme *et al.*, 2018). Endozitosiz inbagnetutako besikulak endosoma goiztiarretara batzen dira, endozitatutako kargoak dagokien helmuga berrira bideratzeko. Hauek, atzera, mintz plasmatikora itzul daitezke, lisosometara bideratu degrada daitezzen edo trans-Golgi zisternetara ere bidali ohi dira berriz exozitosi prozesuan parte har dezaten (Peñalva, 2010; Jovic *et al.*, 2010). Endozitosi gune nagusia hifen apizetik 1-2  $\mu\text{m}$  atzerago aurkitzen da, *endocytic collar* (eraztun subapikala) deritzon eremuan, eta, besteen artean, aktina *patch*-ez osatuta dago (1.3. irudia) (Upadhyay eta Shaw, 2008; Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Honek esan nahi du exozitosia burutzen den lekutik (apizea) bereizita aurkitzen dela endozitosi gunea (subapikala), hifa hazi ahala mintz plasmatikoa eta pareta zelularrean atzera geratzen den materialen endozitosia posible izan dadin. Endozitosi eta exozitosi prozesuen koordinazio egokiak ahalbidetzen du hazkuntza polarizatua eta materialaren distribuzio egokia (Shaw *et al.*, 2011).

Endozitosia bera, hifen hazkuntzan polarizazioa mantentzeko beharrezkoa da (Hervás-Aguilar eta Peñalva, 2010). Polaritate lekuari eustea ezinbestekoa da kargoen askatzea puntara bideratzeko eta hau posible izan dadin hainbat faktorek dihardute (tartean iada aipatu den hainbat elementuren endozitosia eta beraien parte hartzea exozitosi ziklo berrietan). Honen erakusgarri dira polaritate markatzaileak deritzenak. Horien artean, TeaA eta TeaR “*cell-end markers*” markatzaileak apizean aurkitzen dira eta hifaren hazkuntza noranzkoa erabakitzen dute (Takeshita *et al.*, 2008). TeaA nagusiki MT-en bidez iristen da puntara, eta MT-ak

## 1. KAPITULUA:

---

puntarantz hazi ahala mintz plasmakoan aurkitzen den TeaR-rekiko interakzioak lotzen du bertara. Bi markatzaileen interakzioak korrante behera aurkitzen diren osagai gehiagoren batzea abiatzen du, horien artean SepA formina bera, aktina harizpien polimerazioa ahalbidetzen duena (Higashitsuji *et al.*, 2009). Alabaina, puntara batzen den etengabeko material berriaren gehikuntzak polaritate markatzaile horien diluzioa edo sakabanaketa eragingo luke, hazkuntza bera kaltetuz (Takeshita, 2016). Horrela, Ishitsuka eta kideek ikusi ahal izan zuten TeaR markatzaileak izaera dinamikoa duela, puntan TeaR metaketak behatu ostean denbora batera mintzean sakabanatuta ikus zezaketen eta (Ishitsuka *et al.*, 2015). Emaitez *“transient polarity model”* edo polaritate ez-jarrairen eredua proposatzera eraman zituzten. Eredua honen arabera, MT-en hazkuntzaz puntara iritsitako TeaA eta TeaR-ren interakzioak polaritate markatzaileen metaketa eragingo luke. Honek aldi berean aktina harizpien polimerizazioa eragin eta exozitosia bultzatuko lituzke. Exozitosiak, eta ondorioz ematen den mintz plasmako eta pareta berriaren sarrerak, TeaR-en sakabanaketa eragingo luke apize inguruan zehar, polaritatea galduaraziz. Polaritate-lekuaren galera hau, ordea, behin-behinekoa litzateke. Izan ere, jarraian MT berrien etorrerak, TeaA lagun, markatzaileen birpilatzea ekarriko bailuke, berriz polaritate-lekua ezarri eta zikloa itxiz (Ishitsuka *et al.*, 2015). Honek guztiak, bestalde, MT eta aktina harizpien polimerizazio eta despolimerizazio, eta exozitosi/endozitosi prozesuen koordinazioaren beharra agerian utziko lituzke, apizeen estentsioa modu ez-jarraian, pultsoka, gertatuko litzatekeelarik (Bergs *et al.*, 2016; Takeshita *et al.*, 2017).



**1.3. irudia: Kargo eta xixkuen garraio akropetala eta basipetala *A. nidulans* onddoaren hifa begetatibo batean.** Irudia (Taheri-Talesh *et al.*, 2008) lanean aurkeztan dena oinarri hartuta moldatu da. Hazkuntza polarizatua posible izan dadin, mintz plasmatika eta glukodun nahiz kitinadun pareta zelularra osatuko duten materialak puntara garraiatu behar dira. Erretikulu endoplasmatikoan eta Golgiren aparatuan, gehituko den materiala ekoiztu eta prozesatu ostean, besikuletan bilduta MT eta aktinazko zitoeskeletoetan barrena garraiatuko da polaritate gunerantz. MT-tan zehar kinesina proteina motorren eskutik besikulak gune subapikalera garraiatuko dira, gune honetatik apizera arteko azken zatia aktinaharizpietan zehar 5. familiako miosinaren, MyoE-ren, bidez gauzatu delarik. Besikulak apizera ailegatu aurretik *Spitzenkörper* izeneko gune apikalean pilatzen dira, besikula hornitze-puntu gisa, exozitosira bideratuko diren besikulak zuzentzen direlarik bertatik. Hifa hazi ahala, puntara gehitutako materiala atzean geratzen doa. Osagai batzuk endozitatuak izango dira gune subapikalean. Endozitatuak materialak berriro exozitosian lagun dezake, edo eremu distaletarantz, basipetalki, garraiatu daiteke birziklatua izan dadin. Garraio basipetalean dineina proteina motorrak dihardu garraiolari lanetan.

#### 2.1.4. Garraio basipetal edo erretrogradoa.

Endozitosiz barneratutako materialen frakzio bat apizetik atzerantzko bidean (garraio basipetala) garraiatzen da MT-en gainean (1.3. irudia). Zeregin honetan dihardu dineina proteina motorrak, subunitate ugariz osatua dagoena. Dinaktinarekin batera osatutako dineina-dinaktina konplexua MT-en minus ertzerako noranzkoan endosomen garraioaz arduratzen da (1.3. irudia) (Kardon eta Vale, 2009; Abenza *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2015). Dineina, endosoma goiztiarren garraioaz gain, hainbat kargoren garraioaz ere arduratzen da (Egan *et al.*, 2012a; Reck-Peterson *et al.*, 2018). Nukleoaren distribuzio egokian ere ezinbestekoa da (Xiang eta Fischer, 2004).

## 1. KAPITULUA:

---

Hifen baitan, MT-en egituraketa dela eta, hauen minus ertza puntatik urruti dauden guneein (eremu distalak) bat dator. Horregatik du dineinak ezinbesteko funtzioa garraio basipetalean. Egun, ordea, ikusi da badaudela MT-en minus ertzerantz mugitu daitezkeen kinesinak ere, esaterako 14. familiako KlpA kinesina (Popchock *et al.*, 2017). Esan beharra dago kinesinak ere garrantzitsuak direla garraio erretrogradoan, dineinaren “birziklapenean” dihardute eta. Horrela, badirudi 1 familiako kinesina dela dineina eta dinaktina, behin kargoa MT-en minus ertzera garraiatuta, berriz ere plus ertzera garraiatuko dituen (Zhang *et al.*, 2003). Izan ere, dineina-dinaktinaren pilatzea MT-en plus ertzean ezinbesteko urratsa da garraio basipetalaren hasiera eman dadin. Aurretik esan bezala, MT-en plus ertzak eraztun subapikalaren parean pilatzen dira, eta horregatik esaten zaio ere eremu honi dineinaren karga eremua (“*dynein loading zone*”), zeinetan dineina-dinaktina konplexuak kargo berriak lotuko dituen berriz ere basipetalki garraiatzeko (Han *et al.*, 2001b; Cianfrocco *et al.*, 2015). Ziklo hau behin eta berriz errepikatzen da.

Dineina eta kargo arteko interakzioan dinaktina ezinbestekoa da, bere p25 subunitateak bitartekari diharduelarik (Zhang *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2018). Kargo-adaptadore funtzioaz gain, dinaktina bera MT-etara lotzeko gai da p150 subunitatearen bidez (Yao *et al.*, 2012). Dinaktinaren MT-ekiko interakzio hau garrantzitsua da dineinaren funtzioan, MT-etan zehar distantzia luzez desplazatu eta MT-en minus ertzetara iritsi ahal izateko (Zhang *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2015). Elementu gehiagok ere dihardu dineinaren aktibitatearen erregulazioan, mekanismo konplexua osatuz (Cianfrocco *et al.*, 2015). Horien artean, pertsonon Lis1 proteinen ortologoak, NudF-k, rol esanguratsua du garraioa abia dadin, honen gabezia dineina nahiz daramatzen kargoen garraio maiztasuna jaisten baita, nahiz eta abiadura ohikoa mantendu (Egan *et al.*, 2012b).



## 2.2. Garapen asexuala.

Hifak denbora batez hazten aritu ostean gai dira ugalketari bide emateko (Axelrod *et al.*, 1973), betiere ingurune baldintzek eta seinale endogenoek hala agintzen badute. Badirudi hifak airera azalarazteaz, airearekiko nahiz argiarekiko esposizioa direla (ordena honetan) garapen asexuala eragiten duten estimulu nagusiak (Morton, 1961; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Hain zuzen, medio likidoan onddoak hazten jarraitzera jo ohi du, medio solidoan airearekiko kontaktuak konidiazioa ahalbidetzen duen artean (Axelrod *et al.*, 1973; Skromne *et al.*, 1995). Oraindik ere, aire ingurunera azalaraztearen ondorioz, konidioen eraketa eragiten duen mekanismo genetiko/molekular zehatza ezagutzen ez den arren (aurrerago eztabaidatuko da FluG eta beste hainbat erregulatzaileraren parte-hartzea), argiaren bitartekaritza oso garrantzitsutzat jo ohi da (Mooney eta Yager, 1990; Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Argiarekiko menpekotasun hau baina, deskribatuko den bezala, *veA1* mutazioaz gaindi daiteke, iluntasunean ere konidioak era daitezkeelarik.

Alabaina, hazkuntza begetatiboaz bateraezinak diren elikagai urritasunak edo gatz edo estres osmotikoak ere konidiazioa eragin dezakete. Hazte medioan karbono edo nitrogeno iturri eskasiak, garapen asexualaren oinarri diren konidioforo egituren (ikus 1.1. irudian; jarraian ere azalduko dira) eraketa eragiten du bai medio solidoan nahiz likidoan (Skromne *et al.*, 1995). Beti ere, karbono iturriaren gabeziak konidioforo egitura sinplifikatuak osatzen dira. Nitrogeno iturriaren kasuan, ohiko egiturak osatzen diren arren, kopuruz urriagoak direla deskribatu da (Skromne *et al.*, 1995). Bestalde, estres osmotikoa garapen asexualaren induktore izan daiteke, zenbait gatz gehikuntzaz ere ikusi izan delarik efektu hau (Lee eta Adams, 1996). Hala ere, gehiegizko gatz kontzentrazioek hazkuntza nahiz ugalketa ere inhibititu ditzakete (Han *et al.*, 2003).

Konidio espora mitotikoak garapen asexualaren oinarri diren konidioforo izeneko egitura asexual espezializatuetan ekoizten dira (Adams *et al.*, 1998; Yu, 2010), konidioforo bakar bat 10000 konidio izatera irits daitezkeelarik. Inguru baldintzek hala hobetsita, onddoa gai da

## 1. KAPITULUA:

---

patroi genetikoa birmoldatu eta ordura arte hazten ziharduten hifatatik konidioforoak garatzeko (ikus 1.1. irudian ugalketa asexualaren zatia). Oro har, kolonia baten ertzetik atzerago, zaharrenak diren eremuetan, hasten dira konidioforoak eratzen, ertzeko hifek hazkuntzarekin jarraitzen duten artean. Horrela, ondoak substratuaren kolonizazioa nahiz ugalketa/dispersio estrategiak uztartu ditzake. Hifatatik konidioforoaren eraketarainoko trantsizio honetan, zelulen desberdintze-urrats eta aldaketa morfologiko ugari gertatzen da, 1.1. irudiaren behealdean ikus daitekeen bezala (Adams *et al.*, 1998; Etxebeste *et al.*, 2010a). Hasteko, hifa espezifikoen eremu distaletan (ezezaguna da gaur egun oraindik zerk zehazten duen zein hifak hasiko duen garapen asexuala) oin zelula delakoa eratzen da, konidioforoaren zutoina izango dena (Mims *et al.*, 1988). Bertatik, adarkatze gisa, kimu moduko bat hazten joango da polarizazioz. Kimuak dagokion luzera izatea lortzen duenean polarizazioa eten eta kimuaren punta puzten hasiko da isotropikoki besikula deritzona osatze aldera. Besikularen goi gainazalean erretze gune ugari agertuko dira, bakoitzak metula izena duen esterigmata primario bana garatuko duelarik. Metulak polarizazioz apur bat hazi ostean, metula bakoitza puntatik bitan banatuko da, fialida deritzen bi esterigmata sekundario osatzeko. Azken urrats moduan, fialida bakoitzak, espora mononukleatu kate bana eratuko du nukleoaren bikoizketa mitotiko eta basipetal bidez. Honela, konidio gazteenak katearen oinarrian garatuko dira, eta helduenak katearen goialdean. Esporak konidioforotik askatu, barreiatu, eta ingurune egokian pausatzen dira, espora bakar baten erneketak ondoaren bizi-ziklo berri bati hasiera eman diezaiokelarik.

### 2.2.1. Garapen asexualaren kontrol genetiko eta molekularra.

Maila genetiko/molekularrean garapen asexuala kontrolatzen duten bi bide, CDP (*Central Developmental Pathway*) eta UDA (*upstream developmental activation*) bideak, dira hobekien ezagutzen direnak. CDP bideak, konidioforoak osatzeko eman beharreko zelula-desberdintze urratsak kontrolatzen ditu. Bien bitartean, UDA bideko erregulatuzaileek CDP bidearen lehen gene espezifikoaren, *brlA*-ren, adierazpena erregulatzen dute.

### 2.2.1A. Bide genetiko zentrala (CDP: *Central Developmental Pathway*).

Azaldu diren konidioforo eta konidioen eraketa posible egiten duten aldaketa morfologiko gehienez arduratzen diren geneak CDP (*Central Developmental Pathway*) bide genetikoan kokatzen dira. CDP bidearen hezurdura BrlA (*bristle A*), AbaA eta WetA TF (transkripzio faktore)-ek osatzen dute (1.4. irudia), eta konidioforoen eraketan diharduten gainontzeko geneen espresio patroia egokiak (espazialki eta denboran zehar) kontrolatzen dituzte (Adams *et al.*, 1998; Yu, 2010).

CDP bidearen hezurdura horretan lehen mugarrria, beraz, BrlA (*bristle A*) C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> familiako zink-hatz motako TF-a da. *brlA*-ren adierazpena ezinbesteko da CDP bidean korrante behera aurkitzen diren geneak, eta beraz konidiazioa posible egiten duten ondorengo urratsak, abiarazteko. *brlA*-ren mutante nuluak garapen asexuala kimuen estentsio mugagabea gelditua du, besikula, metulak, fialidak eta konidioak osatu gabe gelditzen direlarik. Hortik datorkio, hain zuzen “*bristle*” adiera (Clutterbuck, 1969; Adams *et al.*, 1988). Aldiz, *brlA*-ren gain-adierazpenak hifen hazkuntza eten eta puntatik bertatik konidioen (eta ez konidioforoen) eraketa eragiten du (Adams *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1998). Kanpo seinale inductorak, elikagai urritasuna edo estres baldintzak adibidez, ez dira BrlA-ren gabezia gainditzeko gai, *brlA*-ren aktibazioa konidiazioari bide emateko funtsezko kontrol urratsa dela iradokiz (Adams *et al.*, 1988).

Duen garrantziarekin bat etorrira, *brlA*-ren adierazpenaren kontrola konplexua da. *brlA* locus-aren transkripzioz bi RNA mezulari, *brlAα* eta *brlAβ*, lortzen dira. *brlAβ*-ren kasuan, honen transkripzioa *brlAα*-rena baino ia 1kb lehenago (5´-rantz) hasten da, eta bere baitan uORF (*upstream open reading frame*; ikus doktorego tesi honetako 3. kapituluko 2.1. atala) eremu bat aurkitzen da (Han eta Adams, 2001). uORF honi esker *brlAβ*-ren adierazpena itzulpen mailan ere erregulatzen da, bere kontzentrazioa mugatuz (Han *et al.*, 1993). BrlAβ-k BrlAα-k berak baino 23 aminoazido gehiago ditu N-terminal ertzean, gainontzean biek aminoazido sekuentzia berdinak dituztelarik (Prade eta Timberlake, 1993). Bestalde, *brlAβ*-k *brlAα*-ren transkripzioa erregulatzen du. Bi transkriptoak ezinbestekoak dira garapen asexuala egoki emateko, bataren zein bestearen

## 1. KAPITULUA:

---

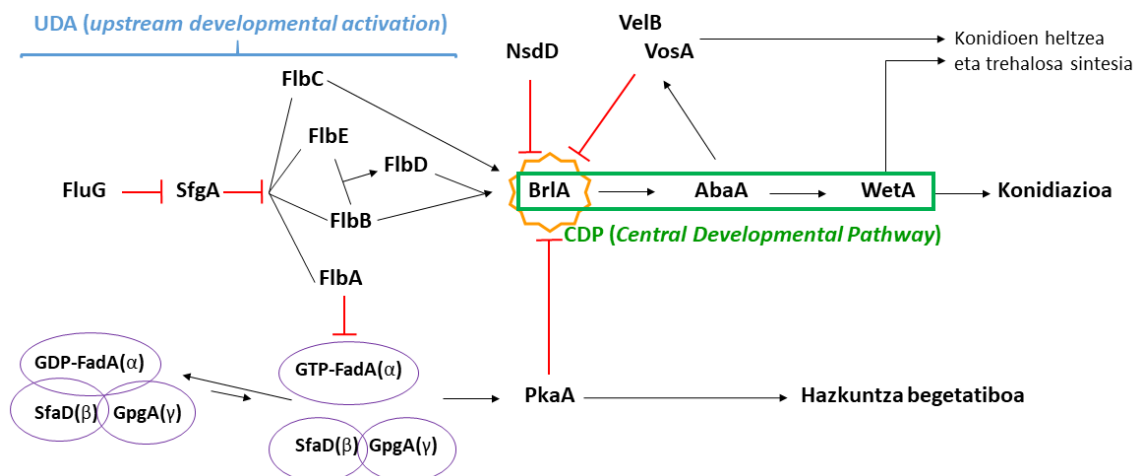
gabeziak edo mutazioek konidioforoen osaketa blokeatzen dutelarik, elkarren artean desberdinak diren morfologia aberranteak eraginez (Fischer eta Kües, 2006). Fenotipo eta espresio patroia desberdinek, bi isoforma hauek garapen asexualaren fase desberdinetan dihardutela iradokitzen dute (Han *et al.*, 1993; Prade eta Timberlake, 1993).

BrlA-k, besteen artean, aurrez aipatutako *abaA* (*abacus A*)-ren adierazpena eragiten du garapen asexualaren erdi-aldeko faseetan (metula eta fialidak osatzen direnean; 1.4. irudia). Badirudi fialiden osaketan ezinbestekoa dela, izan ere *abaA* fondo genetiko nuluari fialida gabeko eta abako itxurako metula-kate egiturak osatzen dira (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al.*, 1990a). Aldi berean, *AbaA*-k 5'-CATTCY-3' (*cis-acting AbaA Response Element*; ARE; non Y-k base nitrogenatu pirimidinikoa adierazten duen) kontsentsu sekuentzia lotzen du erregulatzen dituen geneen promotoreetan (Andrianopoulos eta Timberlake, 1994). Iturri sekuentzia hau bere promotorean eduki eta *AbaA*-k erregulatzen dituen gene horien artean daude garapenean beharrezkoak diren *yA*, *rodA*, *wA*, *wetA*, *vosA*, eta *velB* geneak, baita bere burua bera edo *brlA* ere (ikus Park *et al.*, 2019, artikuluko erreferentziak). *AbaA* bidezko *brlA*-ren adierazpenaren kontrolaren kasuan *AbaA*-ren bitartekaritza konplexua da, egoeraren baitan *AbaA*-k induktore (*AbaA* kontzentrazio altuetan) edo represore (*AbaA* kontzentrazio baxuetan) gisa jardun baitezake (Aguirre, 1993; Han eta Adams, 2001). Zuzenean ala zeharka, tarteko erregulatuzaile negatibo baten bitartez edo ez (*VosA* izan liteke, ikus aurrerago; (Yu, 2010)), *brlA*-ren adierazpenaren eta, oro har, garapen asexualaren erregulazio mekanismoaren konplexutasuna azalarazten ditu *AbaA*-ren jardunak.

Aipatu bezala, *AbaA*-k CDP bidearen bizkarrezurreko hirugarren ardatza, *wetA* (*wet-white A*), aktibatzen du (1.4. irudia). *Wet-white* (*wetA*) mutanteek kolorerik gabeko eta autolisia pairatzen duten konidioak ekoizten dituzte (Sewall *et al.*, 1990b). Bada, badirudi, *WetA*-k garapen prozesuaren fase berantiarretan diharduela konidioen pareta zelularren sintesian, eta ezinbestekoa dela esporen egonkortasunerako (Marshall eta Timberlake, 1991). Garapenaren azken urrats hauetan, *VosA* (*viability of spores A*) TF-a ere ezinbestekoa da

konidioen paretaren osagai den trehalosaren biogenesisian. Aldi berean, VosA *brlA*-ren erregulazio negatiboan diharduela deskribatu da, nolabait konidiazioaren zikloa itxiz (Ni eta Yu, 2007).

BrlA, AbaA eta WetA-k CDP bidearen bizkarrezurra osatzen badute ere, CDP sare konplexuaren barruan elementu gehiagok ere parte hartzen du konidioforo eta konidioen ekoizpenean. Horien artean StuA eta MedA TF-ak aurkitzen dira, zeintzuek, deskribatu denaren arabera, *brlA* eta *abaA*-ren adierazpen patrioiak erregulatzen dituzten denbora eta espazioan, konidioforoen morfologia egokirako ezinbesteko bihurtuz (Aguirre, 1993; Busby *et al.*, 1996; Dutton *et al.*, 1997).



**1.4. irudia: Garapen asexuala kontrolatzen duten bide genetiko nagusien eredu sinplifikatua.** UDA bideak (*upstream developmental activation*) kanpo seinaleen hautemate eta transdukzio lanetan dihardu, eta ondoko geneez osatzen da: *fluG*, *sfgA*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* eta *flbE*. Bide honetako lehen geneak, *fluG*-k, bi mailatan dihardu. Alde batetik, *flbA*-ren transkripzioa induzitzen du, honek aldi berean hazkuntza begetatiboa seinalizatzen duen G proteina heterotrimerikoa erregulatzen duelarik, hazkuntza eten eta garapena sustatuz. Eta bestetik *fluG*-k, *sfgA*-k *flb* faktoreen gainean duen efektu supresorea inaktibatzen du, *flb* geneen adierazpenari bide emanez. Honela, *flbB*/*flbE*/*flbD* faktoreek elkarlanean batetik eta *flbC*-k bestetik, *brlA*-ren adierazpena eragiten dute. BrlA, hain zuzen, CDP (*Central Developmental Pathway*) bidearen lehen gene espezifikoa da. BrlA-rekin batera, gainerako CDP elementuen parte-hartzeaz, konidioforoak osatzeko beharrezko diren aldaketa morfologikoak ahalbidetzen dira. BrlA, AbaA eta WetA TF-ek osatzen dute CDP bide honen bizkarrezurra. BrlA-ren aktibazioa ezinbestekoa da; horregatik, honen adierazpenaren erregulazioan dihardute bai UDA erregulatzailerik, baina baita eragin negatiboa duten inhibitzaileek ere, besteak beste VosA edo NsdD TF-ak.

### 2.2.1B. UDA edo *upstream developmental activation* bidea.

Esan bezala, *BrlA*-ren aktibazioa da garapen asexualaren giltzarria. Horregatik, *brlA* genearen adierazpena nola erregulatu den sakon aztertu izan zen aurreko mendearen bukaeran. Aurrez aipatu bezala, ingurugiroko baldintzen eta zenbait seinale endogenoren arabera, zenbait hifek geneen espresio patroia aldatu, hazkuntza eten eta konidiazioari ekiten diote (Adams *et al.*, 1998). Beraz, badago maila genetikoan eta molekularrean estimulu eragile horiek jaso eta dagokien seinaleak transduzitu egiten dituzten bideak, azken finean, *brlA*-ren adierazpena abiatuko den ala ez erabakiz (Etxebeste *et al.*, 2010). Bide horiek osatzen duten sarea anitza eta konplexua da, oraindik ere guztiz ezagutzen ez dena. Konidiatu ezin duten mutanteen artean, % 83 inguruk garapena abiatzeko ezintasuna zutela kalkulatu zuten (Martinelli eta Clutterbuck, 1971) lanean, honek garapen asexuala aurrera eraman dadin *brlA*-tik korrontean gora aurkitzen diren seinalizazio elementuen garrantziarekin bat egingo lukeelarik. *brlA*-ren adierazpenaren erregulatzaileak identifikatu nahian, bere mRNA-ren maila baxua eta fenotipo akonidiala erakusten zuten mutanteak isolatu eta ezaugarritu zituzten Wieser eta kideek (Wieser *et al.*, 1994). Horrek, fenotipoaren erantzule bezala sei gene desberdinetan zeuden beste hainbat mutazio identifikatzeko aukera eman zien egileei, *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* eta *flbE* (1.4. irudia). Mutante horien hifak etengabe luzatzen dira, aire ingurunera etorritako hifa ugariak osatutako kotoi itxurako “*fluffy*” koloniak sortuz. Honela, aurrez ezaguna zen *fluG* (Adams *et al.*, 1992; Lee eta Adams, 1994) geneaz gainera, *flb* (*fluffy low brlA expression*) adiera eman zitzaizen fenotipo akonidiala eragiten zuten identifikatutako alelo mutante horiei (Wieser *et al.*, 1994). *FluG* eta *FlbA-E*-k, hainbat erregulatzaile gehiagorekin batera, UDA (*upstream developmental activation*) bidea osatzen dute (1.4. irudia), garapen asexualaren indukzioan hobekien ezagutzen den seinalizazio bidea. UDA bideko faktore hauek, hifen hazkuntza begetatiboan zehar, maila detektagarrian presente daude eta deskribatutako kanpo estimuluetako batzuei erantzunez, *brlA*-ren indukzioz, CDP bidea aktibatzea dute helburu.

Ezagutzen den UDA bideko lehen faktorea FluG da, zeinak zuzenean ala zeharka garapen asexualerako beharrezkoak diren bide desberdinak zuzentzen dituen (1.4. irudia). FluG-k zelulaz kanpoko metabolito baten sintesian diharduela deskribatu da, ustez aire ingurunera ateratako hifen gainazalean kontzentratuko litzatekeena eta, beraz, hifak atmosferara irtetea seinaleztatuko lukeena (Lee eta Adams, 1994; Lee eta Adams, 1996). Metabolito hau diorzinol-dehidroaustinol konposatuen aduktua dela proposatu da, konposatu hauek dituzten onddoaren metabolitoen erauzkinak gai direlako  $\Delta fluG$  anduiaren fenotipo akonidiala itzularazi eta konidiatzeko gaitasuna berreskura arazteko (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). Bestalde, *fluG* mutanteen fenotipo akonidiala, VeA erregulatzailearen (ikus aurrerago) *veA1* mutazioak ere itzularazi dezakeela ikusi izan da (Mooney eta Yager, 1990). VeA-k, uhin luzera desberdineko argia jaso eta prozesatu dezaketzen FphA, LreA eta LreB fotoerrezeptorekin batera, konplexua osa dezake, argi estimuluaren eta garapen asexualaren uztarri gisa jokatzuz (Purschwitz *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2010; Bayram *et al.*, 2010). FluG eta VeA-ren harreman genetikoaren jatorria zein den ezagutzen ez bada ere, honek islatzen du UDA transdukzio bidearen baitan seinale desberdinak barne hartzen direla erantzun bateratua aktibatzeko *brlA*-ren promotorean (Etxebeste *et al.*, 2010a).

FluG-k UDA bideko beste elementuekin maila desberdinetan du harremana. Batetik, hazkuntza begetatiboa inhibitzen du FlbA-ren bitartez. Bestetik, garapena asexuala bultzatzen du FlbB, FlbE eta FlbD-k osatzen duten UDA azpibidearen eta FlbC-k definitzen duen beste UDA azpibidearen bitartez (Park eta Yu, 2012; ikus 1.4. irudia ere). Lehenari dagokionez, FluG-k G proteina heterotrimerikoaren erregulatzaile (RGS; *regulator of G-protein signaling*) den proteina kodetzen duen *flbA* genearen adierazpena aktibatzen du (Lee eta Adams, 1996). Proteina heterotrimeriko hori FadA-k (*fluffy autolitic dominant*,  $\alpha$  subunitatea), SfaD-k ( $G\beta$ ) eta GpgA-k ( $G\gamma$ ) osatzen dute eta hazkuntza begetatiboa eragingo luke disoziatua ( $G\alpha$  batetik eta  $G\beta$ - $G\gamma$ , bestetik) legokeenean (ikus 1.4. irudia) (Yu *et al.*, 1996). FluG-k G proteina heterotrimerikoaren

## 1. KAPITULUA:

---

funtzioa negatiboki erregulatzen du, honen disoziazioa oztopatuz (Rosén *et al.*, 1999; Yu, 2006). Ondorioa, garapen asexualaren indukzioa litzateke, hazkuntzaren inhibizioarekin batera.

FluG-k, bestetik, *brlA*-ren promotorea helburu duten FlbB/E/D eta FlbC UDA azpibideen indukzioan dihardu. FlbC C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-erako bi zink-hatz eremu dituen TF-a da, eta *brlA*-ren promotorera zuzenean lotzen da haren adierazpena aktibatzeke (Kwon *et al.*, 2010). *flbC* genearen delezioak fenotipo akonidiala eragiten duen moduan, gain-adierazpenak hazkuntza inhibitu eta *brlA*, *abaA*, eta *vosA* indutitzen ditu. FlbC-ren adierazpen eta kontzentrazioa, nahiz lokalizazio nuklearra, ez ditu *flbB* edo *flbE* geneen gabeziak edo mutazioak baldintzatzen, ez eta alderantziz ere (Kwon *et al.*, 2010). Honela, FlbC FlbB/E/D-k definitzen duten UDA azpibidearekiko paraleloan jarduten zuen beste batean kokatu zuten egileek (1.4. irudia). Konidiazioa aurrera eramateko bi bideak beharrezkoak dira.

Bigarren UDA azpibideari dagokionean, FlbB bZIP (*basic leucine zipper*) motako TF-a bat da. TF-a izaki, nukleoetan pilatzea esperoko litzateke, baina FlbB hifen apizeetan ere kokatzea da bere ezaugarri azpimarragarrienetako bat (Etxebeste *et al.*, 2008). Esporak ernetzeko garaian, polaritatea ezartzeaz batera kokatzen da FlbB eremu honetan, bai eta metulen erneketa gunean eta hauen hazkuntza ematen den bitartean ere, polarizazio guneekin bat eginez (Etxebeste *et al.*, 2009a). Bestalde, FlbB-ren nukleoko lokalizazioa kontzentrazio gradiente bati jarraiki ezartzen da. Puntatik gertueneko nukleoan detektatzen da nagusiki, atzeragoko nukleoetan FlbB-ren presentzia nabarmen jaisten delarik (Etxebeste *et al.*, 2008). Lokalizazio apikalari dagokionez, FlbB UDA bideko bigarren erregulatzailer batekin, FlbE-rekin, batera aurkitzen da puntan. Are gehiago, bietakoren baten gabeziak bestearen deslokalizazioa eragiten du (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-Garcia *et al.*, 2015).

Nukleoetan, TF gisa, FlbB-k cMyb motako bigarren TF bat kodetzen duen *flbD* genearen adierazpena eragiten du. Jarraian, FlbD-rekin batera, FlbB *brlA*-ren promotorera lotzen da honen adierazpena aktibatzeke (Garzia *et al.*, 2010). *flbD*-ren gabeziak FlbB-ren lokalizazio nuklearra nabarmen txikiagotzen du (Garzia *et al.*, 2010); aldiz, FlbD-ren gain-adierazpenak areagotu egin



dezakeela uste da (Otamendi *et al.*, 2019b). Bi TF-en lotura funtzional estuak, nahiz bata zein bestearen gabeziak eragiten duen fenotipo akonidialak, FlbB eta FlbD-ren aktibitateek koordinatuta egon behar dutela iradokitzen dute, *brlA*-ren adierazpena eragingo bada (Garzia *et al.*, 2010).

FlbB-k hifen puntan eta nukleoetan erakusten dituen lokalizazioak bi eremu hauen arteko seinaleren baten transdukzioan diharduela iradokitzen dute. (Herrero-Garcia *et al.*, 2015) lanean, FlbB-FlbE konplexua hifen puntatik igarotzea ezinbesteko urratsa dela frogatu zuten, FlbB TF moduan nukleoan aktiboa izan dadin eta konidiazioa eragin dezan. Nolabait, FlbB hifen puntatik nukleoetarantz garraiatuko litzateke (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014), legokiokeen erantzun mekanismoa aktibatzerara. Honela, eta hazkuntza polarizatuaren ondorioz punta eta nukleoaren arteko distantziak erlatiboki luzeak izanik, FlbB-ren garraio mekanismoa garapenerako beharrezkoa dela agerian geldituko litzateke. Batetik, FlbB eta FlbE-ren garraio akropetalak (puntaranzkoa) aktina eta MyoE proteina motorraren beharra du (Garzia *et al.*, 2009; Otamendi *et al.*, 2019), garraio basipetalak (puntatik nukleoetarainokoak) MT-ekiko dependentzia duen bitartean (Otamendi *et al.*, 2019b).

Egun, oraindik, seinaleen transdukzio sare konplexu honetan diharduten efektore eta horien arteko harremanak ez dira guztiz ezagutzen. Gainera, iada (Lee eta Adams, 1996; Adams *et al.*, 1998; Etxebeste *et al.*, 2008; Etxebeste *et al.*, 2009a) bezalako lanetan, UDA bideko mutanteen fenotipo akonidiala estres baldintza jakinetan itzularazi zitekeela ikusi zuten.  $\Delta flbB$  mutantearen kasuan, esaterako,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  kontzentrazio jakinek eragindako estres osmotikoaz, FlbB-ren gabezia gainditu eta konidiazioa gauzatu zitekeela ikusi zuten doktoregaiaren harrera laborategian (Etxebeste *et al.*, 2009a). Ondorioz, FlbB *brlA*-ren promotorera zuzenean lotzen dela jakinik, azken honen aktibaziorako beste bide genetiko alternatiboren bat egon daitekeela proposatu izan du laborategiko lan-taldeak. Doktoregaiaren tesi lanaren helburuetako bat, hain zuzen,  $\Delta flbB$  fondo genetikoan eta  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -aren gehikuntzak induzitatuko estres egoerapean,

## 1. KAPITULUA:

---

konidiazioa gaitzen duen ustezko bide genetiko alternatiboaren faktore berriak identifikatzea izango da.

### 2.3. Ugalketa sexuala

Ugalketa sexualak, prozesu meiotikoa izanda, onddoaren informazio genetikoaren aldakortasuna ahalbidetzen du. *A. nidulans*-en izaera homotalikoari esker baina, fondo genetiko desberdineko anduien gurutzapenez gain, eduki genetiko bereko bi kolonien gurutzapena ere posible da (Todd *et al.*, 2007a). Ugalketa sexuala kolonia fungikoko gune helduenetan ematen da, hifen fusioaz abiatu eta zatiketa zelular ugariaren ostean askosporak, espora sexualak, ekoiztea duelarik helburu. Gurutzatzera doazen anduien hifen anastomosiaren ondoren (heterokarionteak edo homokarionteak diren hifak osatuz), *crozier* deritzon egitura osatzen da. Crozier honetan, azken-aurreko zelula diploidea da, fusionatu diren bi hifen nukleoek batzearen eraginez. Apizeko eta azken-hirugarren zelulek, ordea, haploide izaten jarraitzen dute (Todd *et al.*, 2007a). Jarraian, azken-aurreko zelulan jazotzen diren zatiketa meiotiko nahiz mitotikoen bitartez, 8 askospora biltzen dituen aska deritzona osatzen da. Ziklo ugariaren ostean (1.1. irudia, goian) osatzen diren askak kleistotezio deritzon pareta gogorreko egitura babesgarri batean biltzen dira. Guztira, kleistotezio bakarrean 10000 askospora aurki daitezkeela kalkulatu da (Pontecorvo *et al.*, 1953). Kleistotezioen garapenaren lehen faseetan, Hülle zelula deritzenak ere agertzen dira hauen inguruan. Proposatu denaren arabera, badirudi, Hülle zelulek elikagai iturri gisa dihardutela garapen sexualean zehar (Dyer eta O’Gorman, 2012). Aldakortasun genetikoa ahalbidetzeaz gain, kleistotezioen babes ezaugarriari esker baldintza bortitzak jasateko gai dira askosporak, optimoak ez diren baldintzapean ondorengotza bermatzeko mekanismoa litzatekeelarik. Inguru baldintzak egonkortzean, kleistotezio eta asken paretak degradatu eta askosporen zabaltzea baimenduko litzateke.

2.4. Garapen asexualaren erregulatzailer negatiboak hazkuntza eta garapen ziklo asexual nahiz sexualaren arteko bidegurutzetan.

Hazkuntza edo garapen moduak elkar bateraezinak lirateke une eta zelula berean, eta zenbait seinalizazio faktoreek, seinaleen transdukzioaz gain, bide bat edo bestea hobetsi arazten dute. Horrela, garapen asexualari zegokion atalean aipatu denaren arabera, zenbait baldintza eta faktoreek konidiazioa bultzatzen bezala, beste batzuk erreprimitu egiten dute hazkuntza edo garapen sexualaren mesedetan.

Hazkuntza begetatiboaren eta garapen asexualaren arteko orekaren kontrolean, adibidez, SfgA Gal4 motako Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> familiako TF-ak konidiazioaren errepresore gisa diharduela deskribatu da (1.4. irudia) (Seo *et al.*, 2006). SfgA, *fluG* eta *flb* geneen artean kokatuko litzateke UDA indukzio bidean, *flb* geneen adierazpena negatiboki erregulatuz.

Aurrez aipatu diren G proteina heterotrimerikoen bide biek ere, FadA(Gα)::SfaD(Gβ)::GpgA(Gγ) nahiz GanB(Gα)::SfaD(Gβ)::GpgA(Gγ), hazkuntza begetatiboa eta garapenaren arteko koordinazioan dihardute (Lafon *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006), forma disoziatuek hazkuntza begetatiboa lehenesten dutelarik cAMP-PkaA kinasaren bitartez (1.4. irudia) (Shimizu eta Keller, 2001).

VeA-k eta honen familiako funtzio anitzeko beste *velvet* erregulatzailerak (VelB, VelC eta VosA) hazkuntza, konidiazioa, garapen sexuala eta metabolito sekundarioen ekoizpena koordinatzen dituzte (Bayram eta Braus, 2012). Horretarako, *velvet* erregulatzailerak elkarrekin edo bestelako proteinek dinamikoki eta aldakorrak diren konplexu proteikoak osatzen dituzte, prozesu horien arteko balantza erabaki eta gauzatzeko. VeA-k, argiaren transdukzioan, konidiazioa erreprimitu eta garapen sexualaren aktibazioan dihardu (Kim *et al.*, 2002). Honela, argitan VeA nagusiki hifen zitoplasman aurkitzen da (Stinnett *et al.*, 2007) garapen asexuala posible izanik (Bayram eta Braus, 2012). Alabaina, iluntasunean, eta α-inportinaren bitartekaritza (Araújo-Bazán *et al.*, 2009), VelB-rekin osatzen duen VelB-VeA heterodimeroa nukleoetara barneratzen da, konplexu honek garapen sexuala bideratzen duelarik (Bayram *et*

## 1. KAPITULUA:

---

*al.*, 2008). Hain zuzen, *veA1* mutazioak VeA eta  $\alpha$ -importinaren arteko interakzioa inhibitzen du. Honen eraginez, VeA1 proteina mutantea nukleoetan sartu ezinik geratzen da, iluntasunean ere konidiazioa eragin daitekeelarik (Stinnett *et al.*, 2007).

VelB bera ere, koordinazio funtzioei erantzunez, VeA-z gainera konplexu desberdinetan ageri da (Park *et al.*, 2012). VosA-rekin batera VelB-VosA heterodimeroak esporen pareten osagai den trehalosaren biogenesian dihardu (Ni eta Yu, 2007). Esporen bideragarritasunerako ezinbestekoa da, beraz. Garapen asexualaren azken faseetan jarduteaz gain, VosA *brlA* genearen promotorean lotzen da honen adierazpena negatiboki erregulatzeko (Ni eta Yu, 2007; Ahmed *et al.*, 2014). Beraz, VosA-k ziklo asexualaren *feedback* lanetan ere badihardu, zikloaren amaiera bultzatuz.

Hain zuzen, *brlA*-ren promotorea erregulazio bidegurutze garrantzitsua da. Garapen asexuala emango bada, *brlA*-ren adierazpena induzituko duten UDA erregulatzailuez gainera, *brlA*-ren promotorean lotuta leudekeen hainbat inhibitzaile ere ezabatu beharko lirateke bertatik (Lee *et al.*, 2016). Horien artean, VosA-z gain, *brlA*-ren adierazpenaren errepresore moduan dihardu NsdD (*never in sexual development*) TF-ak. Garapen asexualaren supresore gisa jarduteaz gainera, Nsd akronimoak adierazten duen bezala, egitura sexualen garapenean ere ezinbestekoa da erregulatzaila hau (Han *et al.*, 2001). NsdD-ren efektu inhibitzailea konidiazioarengan adierazgarria dela deskribatu da. Izan ere, UDA bideko *fluG*, *flbB*, *flbE*, *flbD* edo *flbC* mutanteetan, *nsdD*-ren delezioak fenotipo akonidiala itzularazi eta konidiatzeko gaitasuna berreskurarazten du (Lee *et al.*, 2014). Efektu hau ez da ikusten  $\Delta nsdD; \Delta brlA$  mutante bikoitzaren kasuan (Lee *et al.*, 2014).

Badaude ere NsdD-ren kontrako efektua luketen erregulatzailak. Adibidez, OsaA-k, WOPR familiako TF-a (Alkahyyat *et al.*, 2015), eta UrdA-k, ustez bHLH familiako TF-a (Oartzabal-Arano *et al.*, 2015; Pandit *et al.*, 2018), ugalketa sexualaren inhibizioan eta konidiazioaren indukzioan dihardutela deskribatu da. Izan ere, bakoitzaren mutante nuluak kleistotezioen

kopurua modu esanguratsuan handitzen da, konidioforo eta konidioen kopurua nabarmenki txikitzen den bitartean.

Ikusi bezala, maila genetiko/molekularrean, hainbat erregulatzaile, bide bat baina gehiagotan topa daiteke erregulatzaile positibo edo negatibo gisa. Osatutako bidegurutze nahiz sareek, onddoaren egokitzapenerako eta moldagarritasunerako bide genetikoek konplexutasuna begi-bistaratzeko dute eta, aldi berean, horien azterketa zailtzen dute.



**Helburuak**





## HELBURUAK

Doktorego tesi honetan bi ikerketa-lerro bereizten dira eta horien baitan banatzen dira ondorengo helburu esperimentalak ere:

1. FlbB-ren sintesia eta garraioa kontrolatzen duten mekanismoen ezaugarritzean sakontzea:
  - 1.1. FlbB-ren sintesian eta kontzentrazioan *flbB*-ren promotorean leudekeen bi uORF-ek izan lezaketen funtzioa aztertuz.
  - 1.2. Garraio akropetalean nahiz basipetalean parte hartzen duten elementu berriak identifikatuz, eta FlbB eta FlbE-ren arteko edo FlbB eta FlbD-ren arteko harreman funtzionaletan sakonduz.
  - 1.3. Aurretik *brlA*-ren promotorean FlbB eta FlbD-rentzat proposatu diren ustezko itu sekuentziak konidiaziorako beharrezkoak direnez aztertuz.
  
2. Garapen asexualaren indukzioarako beharrezkoak izan daitezkeen faktore berrien identifikazioa eta euren ezaugarritze funtzionala burutzea:
  - 2.1. Fosfato estrespean akonidialak diren  $\Delta flbB$  mutanteak isolatuz eta fenotipo hori eragiten duten mutazioak identifikatuz.
  - 2.2. Fenotipo horiek eragiten dituzten mutazioak eta dagokien geneak funtzionalki ezaugarrituz.



## **2.KAPITULUA: Materialak eta Metodoak**



## 1. Erabilitako anduiak, oligonukleotidoak eta plasmidoak.

### 1.1. Anduiak.

Hurrengo taulan (2.1), lan honetan erabili diren *A. nidulans* onddoaren anduiak eta horien genotipoak jasotzen dira.

**2.1. Taula:** Lan honetan erabilitako *A. nidulans*-en anduiak. Hainbat andui doktorego lan honetan zehar izan dira sortuak. Gainerakoen jatorria ere adierazten da.

| Andui           | Genotipoa  | Jatorria                              |
|-----------------|--|---------------------------------------|
| BD143           | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | (Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)      |
| BD167           | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | (Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)      |
| BD177           | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2009)         |
| BD178           | <i>pyrG89; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB<sup>Afum</sup>, riboB2,</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; veA1, flbE::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2009)         |
| BD197           | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbD::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2010)         |
| BD198           | <i>pyrG8; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB<sup>Afum</sup></i>   | (Garzia <i>et al.</i> , 2010)         |
| BD209           | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB<sup>Afum</sup></i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2010)         |
| BD228           | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔflbC::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>  | (Kwon <i>et al.</i> , 2010)           |
| BD246           | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2010)         |
| BD274           | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | (Garzia <i>et al.</i> , 2010)         |
| BD375           | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | A. Garzia doktorea                    |
| BD376           | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔbrlA::pyrG<sup>Afum</sup></i>  | A. Garzia doktorea, argitaratu gabe   |
| BD407           | <i>pyrG89; argB2; flbB<sup>(K67A;R68A)</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015) |
| BD455           | <i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>(K67A;R68A)</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>   | (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015) |
| BD635           | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB<sup>(K67A;R68A)</sup>]<sub>nx</sub>::pyroA4, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i> | (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015) |
| BD689           | <i>ΔfluG::pyrG<sup>Afum</sup>, pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | (Iradi-Serrano <i>et al.</i> , 2019)  |
| BD950 (FLIP166) | <i>pyrG89; An12172<sup>lle94Asn</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>, acdA<sup>Leu99Arg</sup>; veA1, riboB2</i>               | Lan hau                               |

## 2. KAPITULUA:

|        |  |                          |
|--------|--|--------------------------|
| BD951  | <i>pyrG89; An12172<sup>lle94Asn</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>, acdA<sup>Leu99Arg</sup>; veA1, riboB2; <b>pRG3-AMA-NotI::socA</b></i>   | Lan hau                  |
| BD955  | <i>pyrG89; An12172<sup>lle94Asn</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>, acdA<sup>Leu99Arg</sup>; veA1, riboB2; <b>pRG3-AMA-NotI::flbB</b></i>   | Lan hau                  |
| BD967  | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB<sup>P</sup>ΔuORF1::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>   | Lan hau                  |
| BD968  | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB<sup>P</sup>ΔuORF2::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>   | Lan hau                  |
| BD1001 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>::pyroA4*, ΔnkuA::argB; veA1, <b>gpdA<sup>P</sup>::flbE<sup>(W11A)</sup>::mrfp::pyrG<sup>Afum</sup></b></i>                   | (Otamendi et al., 2019b) |
| BD1012 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>::pyroA4*, ΔnkuA::argB; veA1, <b>gpdA<sup>P</sup>::flbE<sup>(D70A;D73A)</sup>::mrfp::pyrG<sup>Afum</sup></b></i>              | (Otamendi et al., 2019b) |
| BD1026 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpd<sup>P</sup>::flbE<sup>(1-202)</sup>::flbB<sup>(1-426)</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, veA1</i>   | (Otamendi et al., 2019b) |
| BD1053 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>::pyroA4*, ΔnkuA::argB; veA1, <b>gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::pyrG<sup>Afum</sup></b></i>                                    | (Otamendi et al., 2019b) |
| BD1083 | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>kapA31; ΔflbD::riboB<sup>Afum</sup>, riboB2, veA1</b></i>   | Lan hau                  |
| BD1100 | <i>pyrG89; argB<sup>+</sup>::gpdA<sup>P</sup>::ha<sub>3x</sub>::Ubi4::argB; ΔnkuA::argB; pabaB22, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>::pyroA4*, ΔnkuA::argB; veA1, <b>gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::pyrG, riboB2</b></i> | Lan hau                  |
| BD1111 | <i>pyrG89; argB2; <b>gfp::flbB</b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, <b>gpdA<sup>P</sup>::flbE<sup>(D70A;D73A)</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>,</i>  | Lan hau                  |
| BD1113 |  |                          |
| BD1128 | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>kapA::mRFP::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</b></i>   | Lan hau                  |
| BD1130 | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>kapA::mRFP::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB<sup>Afum</sup></b></i>   | Lan hau                  |
| BD1133 | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB::gfp<sup>(K67A;R68A)</sup>::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, <b>ΔflbD::riboB<sup>Afum</sup></b></i>  | Lan hau                  |
| BD1135 |  |                          |
| BD1139 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, <b>flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>:: flbE<sup>t</sup>, riboB2</b></i>                                       | Lan hau                  |
| BD1140 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, <b>flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a<sup>G17A</sup>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>:: flbE<sup>t</sup>, riboB2</b></i>                        | Lan hau                  |
| BD1148 | <i>pyrG8; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, <b>flbD<sup>(L309A;L312A)</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b></i>   | Lan hau                  |
| BD1150 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, <b>flbD<sup>(L309A;L312A)</sup></b></i>   | Lan hau                  |
| BD1168 | <i>pyrG89; argB2; <b>flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></b>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, <b>flbD<sup>(L309A;L312A)</sup></b></i>  | Lan hau                  |
| BD1172 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>ΔsocA::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</b></i>   | Lan hau                  |
| BD1174 | <i>pyrG89; argB2; <b>ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup></b>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>ΔsocA::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</b></i>  | Lan hau                  |
| BD1177 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>socA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</b></i>   | Lan hau                  |
| BD1179 | <i>pyrG89; argB2; <b>ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup></b>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; <b>socA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</b></i>  | Lan hau                  |

|        |   |         |
|--------|---|---------|
| BD1181 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA<sup>P</sup>::socA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | Lan hau |
| BD1183 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA<sup>P</sup>::socA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>   | Lan hau |
| BD1186 | <i>pyrG89; argB2; flbB<sup>(L333A;L334A)</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>   | Lan hau |
| BD1188 | <i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>(L333A;L334A)</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | Lan hau |
| BD1190 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD<sup>(1-112)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1216 | <i>pyrG8; argB2; pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, flbD<sup>(E14G;R87Q)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1242 | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD<sup>(E14G;R87Q)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1240 | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD<sup>(1-112)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1245 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; socA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | Lan hau |
| BD1247 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA<sup>P</sup>::socA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | Lan hau |
| BD1249 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; socA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>   | Lan hau |
| BD1251 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; gpdA<sup>P</sup>::socA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>   | Lan hau |
| BD1261 | <i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>(L333A;L334A)</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mrfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | Lan hau |
| BD1263 | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1, flbD<sup>(L309A;L312A)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1265 | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1, flbD<sup>(1-112)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1267 | <i>pyrG89; argB2; flbB::gfp::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyroA; veA1, flbD<sup>(E14G;R87Q)</sup></i>   | Lan hau |
| BD1272 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyro; veA1, flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>:: flbE<sup>t</sup>, riboB2</i>                | Lan hau |
| BD1273 | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; hhoA::mCh::pyro; veA1, flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a<sup>G17A</sup>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>:: flbE<sup>t</sup>, riboB2</i> | Lan hau |
| BD1276 | <i>pyrG89, pabaA1; gfp::flbB; hhoA::mrfp::pyrG<sup>Af</sup>; chaA1, nudA1, veA1</i>   | Lan hau |
| BD1281 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, pbriA<sup>P</sup><sub>ΔflbB-BS</sub>::briA</i>   | Lan hau |
| BD1282 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, pbriA<sup>P</sup><sub>ΔflbD-BS1</sub>::briA</i>  | Lan hau |
| BD1286 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, pbriA<sup>P</sup><sub>ΔflbD-BS2</sub>::briA</i>  | Lan hau |
| BD1288 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, pbriA<sup>P</sup><sub>ΔflbD-BS1-2</sub>::briA</i>  | Lan hau |
| BD1289 | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, pbriA<sup>P</sup><sub>ΔflbB-BS;ΔflbD-BS1-2</sub>::briA</i>   | Lan hau |
| BD1291 | <i>pyrG89; An12172::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>, acdA<sup>Leu99Arg</sup>, veA1, riboB2</i>   | Lan hau |
| BD1294 | <i>pyrG89; An12172::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | Lan hau |
| BD1296 | <i>pyrG89; An12172<sup>Ile94Asn</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>   | Lan hau |

## 2. KAPITULUA:

|                |  |  |
|----------------|--|--|
| BD1299         | <i>pyrG89; An12172::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; riboB2, veA1</i>   | Lan hau                                    |
| BD1302         | <i>pyrG89; An12172<sup>le94Asn</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>                                 | Lan hau                                    |
| BD1305         | <i>pyrG89; An12172<sup>le94Asn</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>, acdA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i> | Lan hau                                    |
| BD1308         | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; acdA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>  | Lan hau                                    |
| BD1310         | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; acdA<sup>Leu99Arg</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | Lan hau                                    |
| BD1313         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; acdA::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; riboB2, veA1</i>  | Lan hau                                    |
| BD1316         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; acdA<sup>Leu99Arg</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>                                   | Lan hau                                    |
| BD1319         | <i>pyrG89; An12172<sup>le94Asn</sup>; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>, acdA<sup>Leu99Arg</sup>, veA1, riboB2</i>  | Lan hau                                    |
| BD1323         | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>  | Lan hau                                    |
| BD1327         | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>  | Lan hau                                    |
| BD1330         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>  | Lan hau                                    |
| BD1333         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Pro282Leu</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>                                  | Lan hau                                    |
| BD1351         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Arg762Gly</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>                                  | Lan hau                                    |
| BD1352         | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; pmtC<sup>Tyr767Stop</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1, riboB2</i>                                 | Lan hau                                    |
| CΔTMPBP1       | <i>pabaA1, yA2; ΔtmpB::riboB</i>   | (Soid-Raggi <i>et al.</i> , 2016)          |
| FGSC26         | <i>biA1 veA1</i>   | (Käfer, 1965)                              |
| FGSCA68        | <i>suA1adE20, yA2, adE20; acrA1; phenA2; pyroA4; lysB5; sB3; nicB8; riboB2, veA1</i>   | (Käfer, 1965)                              |
| FGSCA283       | <i>suA1adE20, yA2, adE20; acrA1; galA1; pyroA4 (ssb+); facA303 sB3; nicB8; veA1, riboB2</i>  | Fungal Gen. Stock Center                   |
| FLIP mutanteak | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2; mutazio ezezaguna(k)</i>  | Lan hau                                    |
| MAD1543        | <i>pyrG89, pabaA1, yA2; argB2; kapA::mRFP::pyrG<sup>Afum</sup>; veA1</i>   | (Markina-Iñarraiegui <i>et al.</i> , 2011) |
| MAD1545        | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; kapA31; veA1</i>  | (Araújo-Bazán <i>et al.</i> , 2009)        |
| MAD2698        | <i>pyrG89; pabaA1; gfp::flbB; nudA1; chaA1</i>   | (Otamendi <i>et al.</i> , 2019b)           |
| MAD4324        | <i>pyrG89; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Afum</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>+</sup>::gfp::flbB]<sub>3x</sub>::pyroA4, pabaB22, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>               | (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2015)      |
| RMSO11         | <i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>   | (Stringer <i>et al.</i> , 1991)            |
| TGS6           | <i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔtmpA::argB, veA1</i>  | (Soid-Raggi <i>et al.</i> , 2006)          |
| TN02A3         | <i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>  | (Nayak <i>et al.</i> , 2006)               |



1.2. Oligonukleotidoak.

Ondorengo taulan (2.2), berriz, lan honetan erabilitako oligonukleotidoak zerrendatzen dira.

2.2. Taula: Lan hau burutzeko erabili diren oligonukleotidoak

| Oligonukleotidoa        | Sekuentzia (5'→3')  | Helburua   |
|-------------------------|---|--|
| FlbB-PP1                | GTTTTCTGGTCTCGGTCAACCGGTGG  | <i>flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i> eta  |
| FlbB-GSP4               | GAAAGGTGCGTGGGTTTCAATCCCACC   | <i>flbB<sup>(K67A;R68A)</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i><br>konstrukzioen amplifikazioa   |
| uORF1-SP                | CGAGTCTCGATGGCTTAGCTAGCGACAGTTCC  | <i>flbB<sub>ΔuORF1</sub>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i><br>eta<br><i>flbB<sub>ΔuORF2</sub>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i><br>cassette-en konstrukzioa  |
| uORF1-FP                | GGAAGTGTGCTAGCTAAGCCATCGAGACTCGCGG<br>CACCGAGCCACTAACCAGTGC   |  |
| uORF2-SP                | CGAAGTTCGATTTGAAACGAGTGGGTTCCG  |  |
| uORF2-FP                | CGGAACCCACTCGTTTCAAATCGACTTCGCATCGCA<br>TCAGCCCCAAGAATCTTCATTTGC  |  |
| FlbE-PP1                | GCAACAAATTCGGCTGTTGGGCTCAGG   | <i>gpdA<sup>P</sup>::flbE<sup>(D70A;D73A)</sup>::mrfp</i><br>eremuaren amplifikazioa   |
| FlbE-GSP4               | GCTTACCTGCTGGATCTCCTGCCGGTACTTAGG   |  |
| RFPDw-for-T2A           | AGGTCCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCATGTTAG<br>CAGACTTCTCTGCCCTCGGCGCCGGTGGAGTGGC<br>G                         | <i>flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a</i><br><i>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>:: flbE<sup>t</sup></i><br>eta<br><i>flbE<sup>P</sup>::gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::</i><br><i>t2a<sup>G17A</sup>::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>::</i><br><i>flbE<sup>t</sup></i><br>cassette-en konstrukzioa |
| RFPDw-for-T2A*          | AGGTGCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCATGTTAG<br>CAGACTTCTCTGCCCTCGGCGCCGGTGGAGTGGC<br>G                         |  |
| T2A-for-<br>flbBgeneSP  | GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGT<br>CGAGGAGAATCCTGGACCTATGACTTCGATCAGTA<br>GTAGGCCAATACCCTTGATCTGAAC |  |
| T2A*-for-<br>flbBgeneSP | GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGT<br>CGAGGAGAATCCTGCACCTATGACTTCGATCAGTAG<br>TAGGCCAATACCCTTGATCTGAAC |  |
| FlbD-PP1                | CGACTCCATGACCACATTCC  | <i>flbD::gfp::pyrG<sup>Afum</sup></i><br>konstrukzioen amplifikazioa,<br><i>gfp::flbD</i> , <i>ha<sub>3x</sub>::flbD</i> eta<br><i>flbD*</i> mutanteen cassette-en<br>konstrukzioa   |
| FlbD-PP2                | CATTTGCGAAACTGTGTTGG  |  |
| FlbD-geneSP             | ATGGCTCCAACACACCGTTCG   |  |
| FlbD-GSP4               | GGCAGGCGTTACTGTATACGT   |  |
| FlbD-HA-SP              | CCAACACAGTTTCGCAAATGGGCCGCATCTTTTACC<br>CATAACG   | <i>ha<sub>3x</sub>::flbD</i><br>cassette-aren konstrukzioa   |
| FlbD-HA-FP              | CGACGGTGTGTTGGAGCCATCTGAGCAGCGTAATC<br>TGGAACG  |  |
| FlbD-gfpSP              | CC AAC ACA GTT TCG CAA ATGAGT AAA GGA<br>GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT)                                   | <i>gfp::flbD</i> cassette-aren<br>konstrukzioa   |
| FlbD-gfpFP              | CG ACG GTG TGT TGG AGC CATTTC GTA TAG TTC<br>ATC CAT GCC ATG TGT  |  |
| hhoA-GSP5               | CTACAGTTGAGCCTATGCACAAG   | <i>hhoA::mCh::pyro</i><br>cassette-en konstrukzioa   |
| hhoA-GSP6               | GGCCTTCTTGTCTTAGCAGTC   |  |
| hhoA-GSP3               | ACAGGCAGCCTGGCTTGG  |  |
| hhoA-GSP4               | GCAACAGTCGACAGCACAGC  |  |
| hhoA-GSP3'              | CCAAGCCAGGCTGCCTGTCTGTCTGAGAGGAGGCA<br>CTGATGC  |  |
| hhoA-GSP6'              | GACTGCTAAGAACAAGAAGGCCGGAGCTGGTGCA<br>GGCGCTGGAGCC  |  |

## 2. KAPITULUA:

|                           |  |   |
|---------------------------|--|---|
| FlbD-LigBox*-Up           | CGGATGGGCGCTGACAACGCTTTGAAC  | Mutazio puntual bikoitza<br>FlbD-ren L309A eta L312A<br>aminoazido aldaketerako   |
| FlbD-LigBox*-Dw           | GTTCAAAGCGTTGTGACGCGCCATCCG  |   |
| FlbDsec                   | TCACGGTCTACTTGACC  | <i>flbD</i> -ren sekuentziaioa (5'-<br>3' norabidean)   |
| GFP(NFlbD)sec             | CACTAGTTGGAGAAGCAGC  | <i>gfp::flbD</i> eremuan <i>gfp</i> -ren<br>sekuentziaioa (3'-5'<br>norabidean)   |
| GFPpos-sec                | GTTGCATCACCTTACC   | <i>ORF::gfp</i> konstrukzioetan<br><i>ORF</i> -ren sekuentziaioa (3'-<br>5' norabidean)   |
| GSP2                      | GTT CAA GAG GTT GTC GAG GC   | FlbD <sup>(E14G,R87Q)</sup> kimera<br>adieraziko zuen <i>cassette</i> -<br>aren konstrukzioa  |
| FlbD-Cterm                | CGACAACCTCTTGAACGATCACACGACTC  |   |
| cMybSTOP                  | GAGTCGTGTGATCGTTGAGACCTCTCTTCTTGC  | FlbD <sup>(1-112)</sup> kimera mozketan<br>adieraziko zuen <i>cassette</i> -<br>aren konstrukzioa   |
| GSP3                      | TGAACGATCACACGACTCTCTT   |   |
| FlbB_L333AL334A<br>_Up    | CCTCACAACGGCAGCCAATCTTAGC  | Mutazio puntual bikoitza<br>FlbB-ren L333A eta L334A<br>aminoazido aldaketerako   |
| FlbB_L333AL334A<br>_Dw    | GCTAAGATTGGCTGCCGTTGTGAGG  |   |
| brlAp2Dw                  | GAG GAA GTG GTA AAC TGG CGG ATG G  | <i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbB-BS</sub></sup> :: <i>brlA</i> ;<br><i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbD-BS1</sub></sup> :: <i>brlA</i> eta<br><i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbD-BS2</sub></sup> :: <i>brlA</i> <i>cassette</i> -<br>en konstrukzioa |
| brlA-GSP4                 | CCG CTT CCT ACC CCG AAT GG   |   |
| ΔFlbB-BS-Up               | (GAC GGA GGG ATC TTG AGG AGC) + (CAA GTC<br>GCG AGT AGT AAA CAA ACT AGG C) | <i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbB-BS</sub></sup> :: <i>brlA</i><br><i>cassette</i> -aren konstrukzioa  |
| ΔFlbB-BS-Dw               | GCT CCT CAA GAT CCC TCC GTC  |   |
| ΔFlbD-BS <sup>1</sup> -Up | (GC TGA TTC AGG TCT GTG CGA ACC) + (GAC AGG<br>TCC AGG GCC GTC C)          | <i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbD-BS1</sub></sup> :: <i>brlA</i><br><i>cassette</i> -aren konstrukzioa   |
| ΔFlbD-BS <sup>1</sup> -Dw | GGT TCG CAC AGA CCT GAA TCA GC   |   |
| ΔFlbD-BS <sup>2</sup> -Up | (C GAC TGA TAC GGC AAA GGC TGG) + (CTG ATG<br>GCC AAT GCG ACC TCC)         | <i>brlA</i> <sup>P<sub>ΔflbD-BS2</sub></sup> :: <i>brlA</i><br><i>cassette</i> -aren konstrukzioa   |
| ΔFlbD-BS <sup>2</sup> -Dw | CCA GCC TTT GCC GTA TCA GTC G  |   |
| pRG3Up                    | GAATTCGAGCTCGGTACC   | pRG3 plasmidoaren insertoan<br>sekuentziatzeko oligoak  |
| pRG3Down                  | AAGCTTGCATGCGCGGCC   |   |
| An8501-sek1               | CGTTGGTCCGTTTCGCATGAAGC  | <i>An8501/socA</i> -ren <i>ORF</i><br>eremuaren sekuentziaioa   |
| An8501-sek2               | CGTGTATCGCCGAGATCAGAGG   |   |
| An8501-sek3               | CGTCACTCATAACGTCAGCCACCC   |   |
| An8501-sek4               | GCGAAGCGATCTGTGAGGTCC  |   |
| An8501-PP1                | CGACGAAGGCCCATACCATCC  | <i>An8501/socA</i> -ren delezio<br>eta etiketatzea <i>gfp</i> edo <i>ha<sub>3x</sub></i> -<br>rekin (berezko promotoreaz<br>edo <i>gpdA</i> <sup>P</sup> promotore<br>konstitutiboaz)   |
| An8501-PP2                | CATGAGCAGCGCCCGTCAATGG   |   |
| An8501-GSP3               | TAAGTGTGGTGCCTTCCGACACG  |   |
| An8501-GSP4               | GCAGCAGCCCATCTCGACTTCC   |   |
| An8501-GSP1               | GAGACCAACAACGTCGGCGG   |   |
| An8501-GSP2               | GACGCTCGTCTAGGAGGCG  |   |
| An8501-SMP1               | CCATTGACGGGCGCTGCTCATGACCGGTCGCCTCAA<br>ACAATGCTCT                         |   |
| An8501-GFP1               | CGCCTCCTAGGACGAGCGTCGGAGCTGGTGCAGGC<br>GCTGGAGCC                           |   |
| An8501-GFP2               | CGTGTGCGAAGTGCACCAACTTAGTCTGAGAGG<br>AGGCACTGATGCG                         |   |
| An8501-geneSP             | ATGTCGGAACTCTCCCCAGACG   |   |

|                 |   |   |
|-----------------|---|---|
| An8501-PP2'-ATG | GAGCAGCGCCCGTCAATGG                                       |   |
| An8501-gpdAUp   | CCATTGACGGGCGCTGCTCCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACC               |   |
| An8501-gpdADw   | CGTCTGGGGAGAGTTTCCGACATGGTGATGTCTGCTCAAGCGGGG             |   |
| An6835-Up       | CTTGCATTGGACGACC  | FLIP166-k <i>An6835</i> -n duen mutazioaren sekuentziak   |
| An6835-Dw       | CAGGACAGCTTGAAGTGC  |   |
| An12172-Up      | CAGACGCCACCCTCC   | FLIP166-k <i>An12172</i> -n duen mutazioaren sekuentziak  |
| An12172-Dw      | CTCCTGCATGGATAGCG   |   |
| An8615-Up       | CGAAACTGTCTGAAGATCC                                       | FLIP166-k <i>An8615</i> -n duen mutazioaren sekuentziak   |
| An8615-Dw       | CTTGACGGATCAATCTGC  |   |
| An1459-Up       | GTGGGCTATGACGGC   | FLIP166-k <i>An1459/pmtC</i> -n duen mutazioaren sekuentziak                                      |
| An1459-Dw       | CGGCTAGCTCGTGCG   |   |
| An0560-Up       | CCCAACTAAGCTGATTGCG                                       | FLIP166-k <i>An0560</i> -n duen mutazioaren sekuentziak   |
| An0560-dw       | CCAGCCTGTTCTGTTG  |   |
| An7222-Up       | GCCAGACTTCCACGG   | FLIP166-k <i>An7222</i> -n duen mutazioaren sekuentziak   |
| An7222-Dw       | GGTCGTCACCTAAGGGCG  |   |
| An8821-Up       | GGATGGAACAGCAGTGG   | FLIP166-k <i>An8821</i> -n duen mutazioaren sekuentziak   |
| An8821-Dw       | GGTGTTCAGAGGGGG   |   |
| An12172-GSP1    | GTGGTTACGGGAGTCTTCCAAGTCTTTTCG                            | <i>An12172</i> genearen (WT forma edo FLIP166 mutantearen bertsioa) etiketatzea <i>gfp-z</i>      |
| An12172-GSP2    | GTTTTTCGGCTGTGGAGGAGAAATCCAGC                             |   |
| AN12172-GSP3    | TAGATAACCGTCTTTATTAGAAGTACTGTGC                           |   |
| AN12172-GSP4    | CTGAAGACCTCTGGCCAATGC                                     |   |
| AN12172-GFP1    | GCTGGATTTCTCTCCACAGCCGAAAAACGGAGCTGTGCAGGCGCTGGAGCC       |   |
| AN12172-GFP2    | GCACAGTACTTCTAATAAAGACGGTTATCTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG    |   |
| An12335-GSP1    | CCTCCACTCCGAACAACCAAAAGTCTAACC                            | <i>An12335/acdA</i> genearen (WT forma edo FLIP166 mutantearen bertsioa) etiketatzea <i>gfp-z</i> |
| An12335-GSP2    | GAGAAGACTCTTCAACTTCGAGAACCATTCCGC                         |   |
| AN12335-GSP3    | TAGCTTTGGCTCCTTCGATAGCGTTGTGACG                           |   |
| AN12335-GSP4    | GTTTCTTTCCGCACAGATGGCTAAAGAGGC                            |   |
| AN12335-GFP1    | GCGAATGGGTTCTCGAAGTTGAAGAGTCTTCTCGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC |   |
| AN12335-GFP2    | CGTCACAACGCTATCGAAGGAGCCAAAGCTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG    |   |
| PmtC-GSP1       | CTGGTCATCACTATGGCCCTGAGC                                  | <i>An1459/pmtC</i> genearen (WT forma edo FLIP166 mutantearen bertsioa) etiketatzea <i>gfp-z</i>  |
| PmtC-GSP2       | TTTCGCGAAGTGCAAGTCATAGCCAAGC                              |   |
| PmtC-GSP3       | TAGGAGCATCTGATCTCATCTCGTTCTCTCCC                          |   |
| PmtC-GSP4       | CGCTGTTGTAGCCGATGAAACTGC                                  |   |
| PmtC-GFP1       | GCTTGGCTATGACTTGCACTTCGCGAAAGGAGCTGTGCAGGCGCTGGAGCC       |   |
| PmtC-GFP2       | GGGAGAGAACGAGATGAGATCAGATGCTCCTAGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG   |   |
| PmtC-sek1       | CAGGAACACCTCGATCC   | <i>An1459/pmtC</i> -ren ORF eremuaren sekuentziak   |
| PmtC-sek4       | CACCGCGAACACAGC   |   |

## 2. KAPITULUA:

---

### 1.3. Plasmidoak.

Doktorego tesi honetan zehar erabilitako plasmidoen artean, honakoak *A. nidulans* onddoaren proteinak *Escherichia coli*-n adierazteko erabili ziren:

- **pGEX-2T:** Plasmido hau Pharmacia etxe komertzialetik eskuratu zen eta immunoprezipitazio (*pull-down*) entseguetan erabili zen *Glutathione S-transferase* (GST) proteina kodifikatzen du. Honetatik eratorri dira GST-ri lotutako gainerako fusio proteinak kodetzen dituzten plasmidoak, proteinaren amino ertzean gauzatzen zelarik GST-rekin etiketatzea.
- **pGEX-FlbB 1-426:** *flbB*-ren cDNA osoa daraman pGEX-2T plasmidoa. *E. coli*-n GST::FlbB proteina adierazteko erabili zen (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 115-426:** bZIP eremuari dagokion zatia ezabatua duen *flbB*-ren cDNA daraman pGEX-2T plasmidoa (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 1-426<sup>(C382A)</sup>:** C382A (382. posizioan dagoen zisteinaren aldaketa alaninaz) ordezkapenari dagokion kodoi aldaketa daraman pGEX-FlbB 1-426 plasmidoa (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).
- **pGEX-FlbB 1-426<sup>(C272A)</sup>:** C272A ordezkapenari dagokion kodoi aldaketa daraman pGEX-FlbB 1-426 plasmidoa. Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoreak eraikitako konstrukzioa (Otamendi *et al.*, 2019b).
- **pGEX-FlbB 1-426<sup>(C272A; C382A)</sup>:** C272A eta C382A ordezkapenei dagokien kodoi aldaketak daramatzen pGEX-FlbB 1-426 plasmidoa. Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoreak eraikitako konstrukzioa (Otamendi *et al.*, 2019b).

Bestalde, gerora *A. nidulans*-en protoplastoak transformatu ahal izateko beharrezko ziren DNA konstrukzioak eraikitzeko honako plasmidoak erabili ziren:

- **pgfp::pyrG<sup>Afum</sup> (pFN03):** *gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* fragmentua daraman plasmidoa, proteinak GFP-z etiketatzeko erabilia (Yang *et al.*, 2004).
- **pha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup> (p1503):** *ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Afum</sup>* fragmentua daraman plasmidoa, proteinak HA<sub>3x</sub>-z etiketatzeko erabilia. Eduardo Antonio Espeso (CIB-CSIC-Madrid) ikerleak emana.
- **pgpdA<sup>P</sup>::pyroA\*:** Plasmido honek glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa kodetzen duen genearen promotorearen bertsio murriztua (*gpdA<sup>mini</sup>*) darama (Pantazopoulou eta Peñalva, 2009). Promotore hau geneen adierazpen konstitutiboa indultzeko erabili zen.

*Aspergillus nidulans* onddoaren genoma basatiarekin eta pRG3-AMA1-NotI plasmidoan eraikitako genoteka Fungal Genetics Stock Center-etik eskuratu zen (<http://www.fgsc.net>) (Ikus 5.4 atala kapitulu honetan).

## 2. Hazkuntza baldintza eta *Aspergillus nidulans*-en kultura medioak.

Ondorengo tauletan, *A. nidulans* onddoa hazteko erabilitako kultura medioen (2.3 Taula), kultibo horiek prestatzeko disoluzioen (2.4 Taula) eta erabilitako elikagai osagarrien (edo konposatu toxikoen) (2.5 Taula) konposaketa eta kontzentrazioak azaltzen dira, hurrenez hurren (Käfer, 1965; Cove, 1966). Oro har, onddo laginak 37°C-tan eta 220rpm-tan hazi ohi ziren MMA (*Aspergillus* medio minimoa) edo MCA (MMA gehi legami estraktoa, 5 g/L) medio likidoetan. Protoplastoen lorpen eta transformaziorako, baina, anduiak 30°C eta 150rpm-tan hazten ziren MCA-n. Petri plaketan eginiko medio solidoko kultiboen kasuan agardun (15 g/L) MMA erabili zen, zegokion elikagai osagarriekin, fenotipo azterketa egin eta ekoiztako konidio kantitatea kuantifikatzeko. Kultura medio likido desberdinak inokulatzeko konidio suspentsioak aurretik MMA edo MCA solidotan kultibatutako laginetatik abiatuz prestatu ziren. Bestalde, anduien ezaugarritze fenotipikoa burutzeko ingurune baldintza desberdinak 2.1. puntuan azaltzen

## 2. KAPITULUA:

denaren arabera ezarri ziren. Fluoreszentzia mikroskopiako probetarako *Watch* (WMM) kultura medio minimo likidoa erabili zen (Peñalva, 2005), zegokion elikagai osagarriekin, esporak inokulatuz eta 25°C-tan irabiatu gabe haziz.

### 2.3. Taula: *A. nidulans*-en anduiak hazteko erabilitako kultura-medioak eta horien prestaketa.

| Hazte medioak                     | Prestaketa (litroko)  |
|-----------------------------------|---|
| Medio minimo solidoa (MMA)        | 20ml gatz eta traza elementuen disoluzioa<br>15g agar bakteriologikoa<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>100ml 10x den glukosa disoluziotik. (%2)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik. (5mM)                         |
| Medio minimo likidoa (MMA (l))    | MMA solidoaren moduan baina agarrik gabe  |
| Medio oso solidoa (MCA)           | 20ml gatz eta traza elementuen disoluzioa<br>15g agar bakteriologikoa<br>5g legamia estraktua<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>100ml 10x den glukosa disoluziotik. (%2)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik. (5mM) |
| Medio oso likidoa (MCA (l))       | MCA solidoaren moduan baina agarrik gabe  |
| Birsortze medioa (MMR)            | 20ml gatz eta traza elementuen disoluzioa<br>342g sakarosa (1M)<br>15g agar bakteriologikoa<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>100ml 10x den glukosa disoluziotik. (%2)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik. (5mM)   |
| Birsortze TOP medioa (MMR-TOP)    | 20ml gatz eta traza elementuen disoluzioa<br>342g sakarosa (1M)<br>6g agar bakteriologikoa<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>100ml 10x den glukosa disoluziotik. (%2)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik. (5mM)    |
| Hartzidura medioa (MFA)           | 20ml gatz eta traza elementuen disoluzioa<br>25.0g Corn Steep Liquor (CLS; Sigma-Aldrich)<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>100ml 10x den sakarosa disoluziotik. (%3)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik. (5mM)    |
| <i>Watch Minimal Medium</i> (WMM) | 1mL 1000x den traza elementuen disoluziotik<br>0.5g KCl. (17mM)<br>0.5g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O. (5mM)<br>NaOH-z pH=6,8ra doitu   |

|  |   |
|--|---|
|  | Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min);<br>5mL 5M den NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (25mM)<br>5ml 10x den glukosa disoluziotik (%0.1 p/v)<br>10ml 100x den amonio tartrato disoluziotik (5mM) |
|--|---|

**2.4. Taula: A. nidulans-en anduiak hazteko kultura medioak prestatzeko disoluzioak.**

| Disoluzioak                                | Prestaketa (litroko)  |
|--|---|
| Traza elementuen disoluzioa (1000x)        | 22g ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O<br>11g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub><br>5g MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O<br>5g FeSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O<br>1,6g CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O<br>1,6g CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O<br>1,1g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O<br>50g Na <sub>2</sub> EDTA<br>KOH-z pH=6.5-6,8ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)<br>4°C-tan gorde argitik babestuta |
| Gatz eta traza elementuen disoluzioa (50x) | 26g KCl<br>26g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O<br>76g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>50ml 1000x den traza elementuen disoluziotik<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)<br>Argitik babestuta gorde   |
| Glukosa disoluzioa %20 (10x)               | 200g glukosa<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)   |
| Galaktosa %10 (10x)                        | 10g galaktosa<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)  |
| NaAc 3M (20x)                              | 246.1g sodio azetato<br>Azido azetikoaz pH=6ra doitu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)   |
| Sakarosa %30 (10x)                         | 300g sakarosa<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)  |
| Amonio tartrato disoluzioa 0.5M (100x)     | 92g amonio tartratoa<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)   |
| Fosfato disoluzioa 5M                      | 600g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)  |
| Bitamina disoluzio kontzentratua (100x)    | 50.0mg tiamina<br>10.0mg biotina<br>100.0mg azido nikotinikoa<br>200.0mg kaltzio D-pantotenatoa<br>50.0mg HCl-piridoxina<br>100.0mg riboflabina<br>100.0mg azido p-aminobenzoikoa (PABA)<br>24.0g inositol<br>Filtrazioz esterilizatu<br>4°C-tan gorde argitik babestuta  |

## 2. KAPITULUA:

**2.5. Taula:** Hazte mediora gehitutako elikagai osagarriak, horien stock kontzentrazioak eta prestaketa.

| Disoluzioak                               | Prestaketa (100mL prestatzeko)  |
|---|---|
| Arginina ( $10^2x$ )                      | 6.97g arginina disolbatu (0.04M)<br>NaOH-a gehitu ez bada disolbatzen<br>Filtraziaz esterilizatua eta 4°C-tan gorde |
| Azido nikotinkoa ( $10^2x$ )              | 10mg azido nikotinkoa (0.8M)<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min) eta 4°C-tan gorde                           |
| Azido p-aminobenzoikoa (PABA) ( $10^3x$ ) | 200mg azido p-aminobenzoikoa (14mM)<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min) eta 4°C-tan gorde                    |
| Biotina ( $10^4x$ )                       | 10mg biotina (0.004mM)<br>Filtraziaz esterilizatua eta 4°C-tan gorde  |
| Fenilalanina (50x)                        | 3,3g fenilalanina (0.2M)<br>Filtraziaz esterilizatua eta 4°C-tan gorde  |
| Piridoxina ( $10^3x$ )                    | 50mg piridoxina (2.5mM)<br>Filtraziaz esterilizatua eta 4°C-tan gorde   |
| Riboflabina ( $10^2x$ )                   | 25mg riboflabina (0.6mM)<br>Filtraziaz esterilizatua eta argitik babestuta gorde<br>4°C-tan                         |
| Lisina                                    | 0.15g lisina (momentuan pisatu eta mediora zuzenean gehitu)   |
| Uridina                                   | 0,122g uridina (momentuan pisatu eta mediora zuzenean gehitu)   |
| Uraziloa                                  | 0,056g uraziloa (momentuan pisatu eta mediora zuzenean gehitu)  |
| Akriflabina (200x)                        | 500 mg<br>Filtraziaz esterilizatua eta alikuotak -20°C-tan gorde  |
| Benomiloa                                 | 200mg, etanoletan %95 den 100mL-tan disolbatu<br>Filtraziaz esterilizatua eta alikuotak -20°C-tan gorde             |
| Sodio selenatoa ( $10^2x$ )               | 1,89 g (0,1M)<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min) eta 4°C-tan gorde  |
| Metionina ( $20^3x$ )                     | 5,97 g (0,4M)<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min) eta 4°C-tan gorde  |



2.1. Aspergillus nidulans-en anduien ezaugarritze fenotipikoa.

Bosgarren kapituluaz azaltzen diren FLIP mutanteen ezaugarritze fenotipikoa ingurune baldintza desberdinetan burutzeko kultura medio desberdinak prestatu ziren MMA medioa oinarri hartuta. Ezaugarritze lanetan ardatz gisa 0.65M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fosfato gatza erabili zen, eta bosgarren kapituluaz gain doktorego lan guztian zehar sarritan baliatu zen medio hau. Elikagai urritasunaren eragina aztertzeo esperimenduetan karbono (glukosa) edo nitrogeno (amonio tartratoa) iturrien ohiko kontzentrazioa %20ra jaitsi zen. Bestalde, 1M sakarosa, 0.6M/0,05M KCl/MES (azido 2-[N-Morfolino]jetanosulfonikoa) edo 0.18M MgCl gehitu ziren gatz estresa edo estres osmotikoa eragiteko, eta ur oxigenatua (6mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) estres oxidatiboa indultzeko. Aztertu nahi ziren mutanteak hiru egunez medio solidoan 37°C-tan hazten eduki ostean, Nikon Coolpix8400 kamera batekin erregistratu ziren fenotipoak.

pH-aren eragina aztertzeo bi saiakuntza prestatu ziren. Lehenengoan, fosfato tanpoi bat prestatu zen NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5M) eta Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2M) disoluzioetatik abiatuta. Fosfato tanpoiak (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) medioaren pH maila 6.8 inguruan mantenduko zuen, ohiko hazte medioaren pH balioa alegia. Tanpoia prestatzeko 12mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5M) eta 35mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2M) gehitu ziren 200mL MMA medio solidoko, honen PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> kontzentrazioa aurreko probetan bezala 0.65M-koa izango zen artean. Bigarren pH probarako, bi medio berri prestatu ziren. Lehenean, MMA prestatzean bertan gehitu zen beharrezko fosfatoa eta ondoren doitu zen pH-a 6.8ra NaOH-z. Bigarrenean, aldiz, MMA-ren pH-a 4.24-ra doitu zen HCl-az (fosfato azidoa gehitzean pH jaitsierak ematen duen baliora arte).

2.2. Ernamuintze eta adarkatze azterketak medio likidotan.

Aztergai zen anduiaren konidioak Tween®20 (%0.02 v/v)-tan bildu ziren eta 2.5·10<sup>6</sup> konidio/mL inokulatu ziren hazteko beharrezko ziren elikagai guztiak zituen MMA medio likidotan. Kultiboak 37°C-tan agitazioaz hazten jarri ziren eta 6, 8, 10 eta 12 ordura laginak hartu

## 2. KAPITULUA:

---

ziren anduien ernamuintzea eta adarkatzea aztertzeko. Ernamuindutako eta ernamuintzeke zeuden konidiak zenbatzeko hemozitometroa (Thoma) erabili zen. Ernamuindutakoen artean, ernamuintze hodi bakarra, bi edo hiru sortutakoak kuantifikatu ziren. Irudiak jasotzeko Optiphot (Nikon) mikroskopioa erabili zen.

### 2.3. Hazkuntza azterketak MMA medio likidotan.

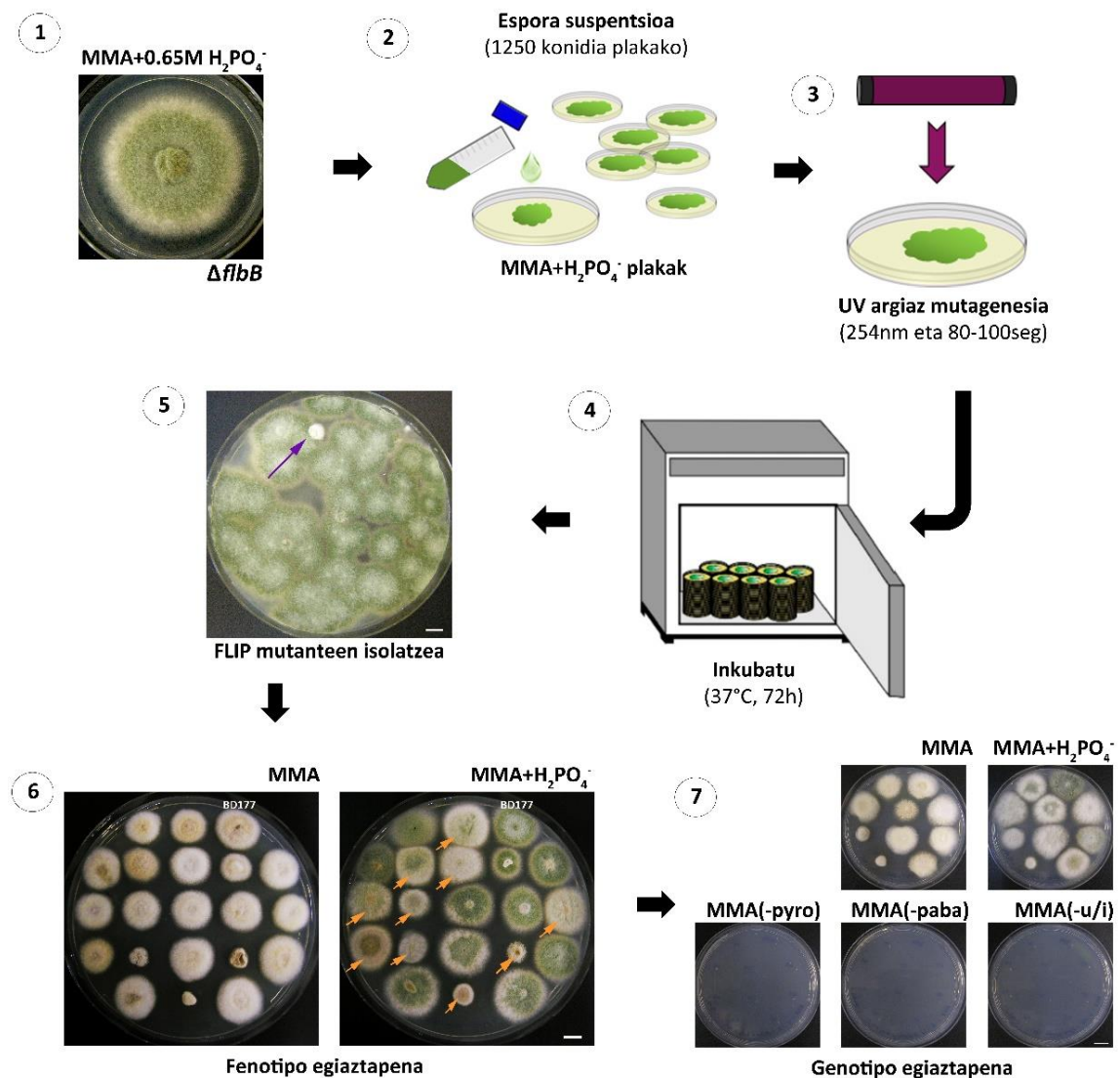
Anduiak hazteko beharrezko ziren elikagaiak zituen 25mL MMA medio likidotan  $10^6$  espora/mL inokulatu ziren. Kultiboak 20 orduz 37°C-tan hazi ziren agitazioz. Behin laginak hazirik, alikuotak porta gainean ezarri ziren mikroskopian aztertu ahal izateko. Hifen morfologia ezaugarriak irudietan jasotzeko Optiphot (Nikon) mikroskopioa erabili zen. Esperimentua 24 eta 28 ordura errepikatu zen konidioforoen garapena edo bestelako aldaketa morfologikorik gertatu ote zen behatzeko.

## 3. Esporen kuantifikazioa.

Konidioen kuantifikazioa burutzeko, aztergai zen anduia 55mm-ko diametroan Petri plaketan inokulatu zen *point inoculation* moduan. Laginak 37°C-tan 72 orduz hazten eduki ostean, koloniaren diametroa neurtu eta esporak 1mL Tween®20 (%0.02 v/v)-tan bildu ziren 15mL-ko hodiedetan. Bertatik 1:20 diluzio (edo kasuan kasuko diluzioa) bat egin zen hemozitometro (Thoma) batean esporen kuantifikazioari ekiteko. Horretarako, 40x handipeneko lentedun mikroskopioa (Optiphot, Nikon) baliatu zen. Konidioen kantitatea eta koloniaren diametroaren balioaz konidien kontzentrazioa kalkulatu zen,  $\text{cm}^2$ -ko. Andui bakoitzeko hiru erreplikaren zenbaketaz batezbesteko balioak eta neurketaren errore estandarrak erdietsi ziren (Etxebeste *et al.*, 2012).

#### 4. Ausazko mutagenesi prozedura argi ultramoreaz.

Bosgarren kapituluaren aipatzen diren FLIP mutanteak lortu ahal izateko argi ultramore (UV) bidezko mutagenesi protokolo bat jarraitu zen (Garzia *et al.*, 2009). Ondorengo 2.1. irudian, mutagenesi prozedura jarraitu zen bideorria irudikatzen da. UV erradiazio iturri gisa MINERALIGHT LAM MODEL UVGL-58 lanpara erabili zen, lanerako 254 edo 365nm-tako uhin luzerak erabiltzeko aukera ematen zuena. Mutagenesirako 254nm-tako uhin luzera eta 80-100 segundotako esposizio denborak erabili ziren (%5-eko biziraupen tasa).



**2.1. irudia: FLIP mutanteak lortzeko mutagenesi eta egiaztapen prozedura.** 1)  $\Delta flbB$  anduiaren fenotipoa 0.65M  $H_2PO_4^-$ -dun MMA medioan.  $\Delta flbB$  anduia hartu zen abiaburuko parental gisa, UDA bidea inaktibatuta eduki arren fosfato estres baldintzetan konidiatzeko gai delako. 2)  $\Delta flbB$  anduiaren esporea suspentsiotik 1250 konidio inokulatu ziren 0.65M fosfatodun MMA plaka bakoitzeko. 3) Ausazko

## 2. KAPITULUA:

---

mutagenesia burutzeko, plakak UV argiaz (254nm) irradiatu ziren 80-100 segunduz. 4) Irradiatutako plakak 37°C-tan eta 72 orduz inkubatu ziren. 5) FLIP (*fluffy in phosphate*) fenotipoa zuten koloniak isolatu ziren. Irudian gezi morez adierazten den kolonia akonidialaren modukoak aukeratu ziren. 6) Fenotipoa egiaztatzeko isolatutako hautagaiak fosfato eta fosfato gabeko MMA medioan inokulatu ziren berriz ere. Gezi laranja adierazten dira ontzat jo ziren hautagaien adibideak. 7) Kontaminazioak baztertzeko eta hautagaien genotipoa egiaztatzeko irudiko probak burutu ziren. Jatorrizko parentalak behar dituen elikagai osagarriren baten faltan ez parentala ezta FLIP hautagaiak ere ez dira hazteko gai.

Mutagenesiaz FLIP (*fluffy in phosphate*) mutanteak isolatu nahi zirenez, selekzio medio moduan 0.65M fosfatodun MMA zuten 14cm-ko Petri plakak prestatu ziren.  $\Delta flbB$  anduiaren konidioak Tween®20 (%0.02 v/v)-tan bildu (1 zenbakiarekin 2.1. irudian) eta 1250 konidia inguru inokulatu ziren plaka bakoitzeko (2). Inokulatu eta segidan, plakak argi UV-z mutagenizatu ziren (3) eta jarraian hiru egunez 37°C-tan hazten eduki ziren (4). Mutagenesi prozesuan, kontrol moduan, inokulatutako plaketako bat UV-ren eraginpetik kanpo uzten zen. Populazio maila kontrolatzeko aukera ematen zuen honek. Hiru egunen buruan akonidialak ziren mutanteak identifikatu (5) eta 0.65M fosfatodun MMA plaka berrietara transferitzen ziren FLIP fenotipoa baieztatzeko (6). Fenotipo egiaztapenez gainera, hautagaien genotipoa ere baieztatzen zen, andui parentalak behar zituen elikagai osagarrietatik aldiro bat faltan zuten MMA plakatan inokulatuz mutante bakoitza eta hauetan hazteko gai ziren ala ez behatuz (7).

## 5. *Aspergillus nidulans*-en protoplastoen lorpena eta transformazioa.

Genotipo jakineko *A. nidulans* onddoaren anduiak sortzeko, protoplastoak lortu eta transformatu ziren aurrez eraikitako DNA *cassette*-ekin (ikus 5.1. eta 5.2. atalak). Protoplasto pareta zelularrik gabeko zelulei deritze eta DNA molekula sintetikoaren barneratzea posible egiten dute. Transformazioak burutzeko laborategian ohiko den protokoloa jarraitu zen (Tilburn *et al.*, 1983; Szewczyk *et al.*, 2006).

### 5.1. Protoplastoen lorpena.

Lehenik, transformatu nahi zen anduiaren protoplastoak lortu behar ziren. Anduiaren konidioak Tween 20 soluzioan (%0.02) bildu eta  $2.5 \cdot 10^6$  espora/mL inokulatzeko ziren anduiak beharrezkoak zituen elikagaiak zituen 150mL MCA likidotan, 500mL-ko erlenmeyerretan. Laginak 14 orduz 30°C-tan hazten edukitzen ziren, 150rpm-ko agitazioaz. Onddoaz hazi ostean, mizelioa Miracloth™ esterilaz filtratu eta 1.5-1.8g lagin jaso ohi ziren aurrera jarraitzeko. Bildutako mizelioa beharrezko elikagaiak zituen 16mL MCA likido eta 16mL *protoplasting solution* delakoa (2.6 Taula) zituen nahaste batean erresuspenditu zen, 100mL-ko erlenmeyerretan. *Protoplasting* soluzioak VINOTASTE entzima darama zelulen pareta zelularra liseritu ahal izateko. Liseriketa hau aurrera eramateko, mizelio nahastea 30°C-tan eta 100rpm-ko agitazioaz inkubatu zen 90-120 minutuz. Hirurogeigarren minututik aurrera, eta lorpen prozesua kontrolatzeko, digestioaren alikuotak mikroskopioan behatzen ziren 15 minuturo.

Protoplastoak lortu zirela baieztatu ondoren, horien erauzketa eta garbiketekin jarraitu behar zen. Horretarako, liseriketa nahastea aurrez hotzean edukitako 1,2M sakarosadun disoluzio baten (2.6 Taula) 16mL zituzten 50mL-ko bi hodietan banatzen zen. Urrats hori pipeta automatiko baten laguntzaz burutzen zen, digestio nahastea pixkanaka eta modu jarraituan isuri zedin hodiaren paretatik herrestan. Hodiak 4°C-tan zentrifugatzen ziren 10 minutuz 1800 xg-tan. Zentrifugatu ostean protoplastoek osatutako geruza bat antzeman zitekeen interfase moduan. Hau Pasteur pipeta batez hirugarren hodi batera pasatzen zen. Bildutako protoplasto bolumenaren KCl 0.6M (2.6 Taula) bikoitza gehitzen zen eta, bigarren aldiz, hodia 10 minutuz zentrifugatzen zen, 4°C eta 1800 xg-tan. Kasu honetan baina, protoplastoak hodiaren behealdean prezipitatu ohi dira "*pellet*" bat osatuz. Gainjalkina baztertu eta protoplastoak zituen hauspeakinaren garbiketaz jarraitzen zen, 2mL 0.6M KCl-tan birsuspendituz eta 1.5mL-ko bi hoditan banatuz. Bi hodiak zentrifugatu (2400 xg, 3min eta giro tenperaturan) eta garbiketa urrats hau bigarrenez errepikatzen zen. Azken garbiketaren ostean, bi hodietan prezipitatutako

## 2. KAPITULUA:

---

frakzioak 0.6M KCl eta 50mM CaCl<sub>2</sub> zituen (2.6 Taula) disoluzio baten 1mL-tan batu ziren, berriz ere zentrifugatzeko. Azken pauso hau errepikatu egin zen transformatzeko prest zeuden protoplastoen suspentsioa lortuz.

### 5.2. Protoplastoen transformazioa.

Behin protoplastoak edukirik, transformazio nahastea 50mL-ko polipropilenoazko hodietan prestatzen zen, lehenik 100µL protoplasto eta hauek transformatzeko erabili nahi zen DNA *cassette*-aren 5-10µL bitarte gehituz. DNA-ren barneratzea errazteko nahaste hodia 6-8 aldiz irabiatzen zen *vortex*-aren laguntzaz (abiadura maximoan). Jarraian, PEG soluzioaren (8. soluzioa; 2.6 Taula) 50µL gehitzen ziren eta berriz ere segundu bateko 4-5 txandatan irabiatzen zen (*vortex*). Azkenik, transformazio nahastea izotzetan (0°C-tan) uzten zen 25 minutuz.

Ondoren, 8. soluzioaren 1mL gehitu eta nahastea zuen hodia hatzen laguntzaz nahasten zen, beste 5 minutuz giro tenperaturan inkubatuz. Azkenik, nahastera, 7. soluzioaren 5mL eta MMR-TOP medioaren 15mL (aurrez urtua eta 40 °C inguruan aurkitzen zena) gehitzen ziren transformazio plakak nahastearekin inokulatu ahal izateko.

Transformazio plakak aurrez prestatzen ziren MMR medio selektiboa gehituz, alegia, soilik transformanteen hazkuntza baimenduko lukeen MMR medioa gehituz. Horretarako, medioan andui parentalak beharrezko zituen elikagai osagarri guztiak gehitzen ziren, transformaziorako erabilitako DNA *cassette*-an txertatutako selekzio markadoreari (*pyrG<sup>Afum</sup>* edo *pyroA<sup>Afum</sup>*) zegokion elikagaia (uridina/uraziloa edo piridoxina, hurrenez hurren) ezik. Transformazio guztietan, bideragarriak ziren protoplastoak erabili zirela ziurtatzeko, medio ez-selektiboa zuen plaka bana prestatzen zen. Plaka honetan transformatutako eta transformatu ez ziren protoplastoak hazi behar ziren, plaka guztia ondoz beteta geratuz. Hori gertatzen ez bazen, transformazioaren emaitza zalantzarritzat jo eta transformazioa errepikatzen zen. Prozeduran zehar ere, DNA *cassette*-rik gabeko nahaste bat prestatzen zen, kontrol negatibo

moduan. Nahaste hau zuen hodiarekin gainerako laginen prozedura bera jarraitzen zen, baina DNA *cassette*-rik ezean, medio selektiboan ezingo litzateke transformanterik hazi. Aurkako emaitza batek prozeduran zehar kontaminazioaren bat jazo zela adieraziko zigukeen.

Inokulatu eta gero, transformazio nahiz kontrol plakak 37°C-tan inkubatzen ziren 2-3 egunez. Lortutako transformanteak MMA medio selektiboko plaka berrietara transferitzen ziren birritan, lanean jarraitu aurretik. Purifikazio plaka horien artean kontrol plaka gehiago ere jartzen ziren transformazio prozesuaren zilegitasuna ziurtatzeko. Batetik, lehen plaketan, transformanteak hazteko behar luketen elikagai espezifiko bat kentzen zen mediotik kontaminaziorik eman ez zela ziurtatzeko; eta bestetik, medio ez-selektiboaz bigarren kontrol plakak prestatzen ziren andui parentala ere hazten zela baieztatzeko.

Honako taulan protoplastoen lorpen eta transformazioan erabilitako disoluzioen konposizioa eta prestateta deskribatzen da.

**2.6. Taula:** Protoplastoen lorpenerako nahiz transformaziorako erabilitako disoluzioak.

| Soluzioak   | Prestaketa (100mL)  |
|---|---|
| KCl+ Azido zitriko disoluzioa   | 8.2g KCl<br>2.1g azido zitriko monohidratoa<br>50mL H <sub>2</sub> O-tan disolbatu;<br>pH-a 5.5ra doitu 1.1M KOH-z eta<br>bolumena 100mL-ra eraman.<br>Filtrazioz esterilizatu eta 4°C-tan gorde<br>(gehienez ere bi astez) |
| <i>Protoplasting solution</i> (16mL)<br>(erabili baino 30 minutu lehenago prestatu<br>eta 4°C-tan gorde bien bitartean) | 2.048g Vinotaste entzima (Novozymes)<br>16mL KCl+azido zitrikotan disolbatu   |
| 0.6M KCl  | 4.47g KCl<br>100mL-tan disolbatu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)   |
| 0.6M KCl+ 50mM CaCl <sub>2</sub>  | 4.47g KCl<br>0.74g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O<br>100mL-tan disolbatu<br>Autoklabean esterilizatu (110°C, 20min)   |
| 7 soluzioa (100mL)  | 18.22g sorbitol<br>1mL TrisHCl (1M, pH=7.5)<br>1mL CaCl <sub>2</sub> (1M)<br>Ur distilatuaz 100mL-ra arte enrasatu eta<br>autoklabean esterilizatua   |

## 2. KAPITULUA:

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| 8 soluzioa (100mL) | 60g PEG (polietilenglikola, PEG6000, Fluka)<br>1mL TrisHCl (1M, pH=7.5)<br>1mL CaCl <sub>2</sub> (1M)<br>5mL ur distilatu gehituta, PEG-a mikrouhinean urtu eta 100mL-ra arte ur distilatuaz enrasatu.<br>Autoklabean esterilizatua |
|--------------------|---|

### 5.3. Azido 5-Fluoroorotikoaz (FOA) transformazioa.

Kasu batzuetan, transformazioa genoman aurrez integratua zegoen *pyrG<sup>Afum</sup>* selekzio markatzailea ordezkatzeko egin zen. Honen ordeztan, beste selekzio markatzailearik ez zuen DNA *cassette*-a txertatuarazi zen genoman. Era honetan, transformanteek *pyrG<sup>-</sup>* genotipoa izango zuten, protoplasto parentalek (ez transformatuak) *pyrG<sup>+</sup>* genotipoa izango luketen bitartean. Honek arazo bat eragiten zuen transformanteen selekzioa egiteko eta, horregatik, azido 5-fluoroorotiko monohidratatua (FOA) gehitu zen (2mg FOA MMR medioaren mL-ko) transformazio plakatan. FOA-k *pyrG<sup>+</sup>* genotipodun kolonien hazkuntza inhibitzen du, *pyrG<sup>-</sup>* genotipodunena baimentzen duen bitartean. Honez gain, transformazioa amaitu eta 24 ordura, FOA gehiago gehitzen zen transformazio plaken gainean, MMA-ren 8mL-tako suspentsio eran, plaken azalera osoa estaliko zuen selekzio geruza osatuz. Transformanteen purifikaziorako ere FOA-dun selekzio medioa erabili zen.

### 5.4. Genotekaz transformazioa.

Erabilitako genoteka pRG3-AMA-NotI plasmido autoerreplikakorrean eraikia dago, eta Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net>) erakundetik eskuratu zen. Genotekak *A. nidulans* onddoaren genoma basati osoa ordezkatzeko duela onartzen da, genomaren zati guztiak pRG3 plasmido autoerreplikakorrean behar bestetan errepikatuta baitaude hori ziurtatuko duen probabilitateaz. Intereseko anduiaren protoplastoak genoteka honen alikuota batekin (1µL) transformatu eta gero, transformatutako protoplasto bakoitzak genotekako plasmido bat ausaz hartzearekin batera, *A. nidulans*-en genomaren zati espezifiko bat eta baita honek kodetzen duen funtzioa ere edukiko du gehigarri. Protoplasto mutanteren batek bere mutazioari dagokion



genearen bertsio basatia duen plasmidoa jasotzen badu, mutazio horrek eragiten duen fenotipoa itzularazi egin beharko litzateke (supresioa). Genotekaz egindako transformazioetan genoteka laginik gabeko kontrol negatiboa ere prestatu zen. Medio ez-selektibodun plaka bana ere prestatu eta inokulatu zen transformazio hodi bakoitzeko. Genoteka bidezko transformazioaren efizientzia altua dela eta, azken urratsean transformazio hodie 45mL MMR-TOP gehitu zitzaizkien, eta aldi berean hodi bakoitzaren edukia beste lauetan diluitu zen. Ondoren, transformazio hodien edukia aurrez prestatutako MMA+KCl/MES (0.6M/0.05M, hurrenez hurren) medio selektiboan (uridina eta urazilo gabeak) plakeatu zen (30 plaka hodi bakoitzeko). Transformazioa amaitu eta 24 ordura, plaken gainaldean 0.65M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -dun MMA selektibo geruza mehe bat gehitu zen FLIP fenotipoa (akonidiala kultura medio horretan)  $\Delta flbB$  parentalaren fenotipora (konidiantea kultura medio horretan) itzularazia zuten transformanteak errezago identifikatu ahal izateko.

Transformazioa burutu eta bi egunera, 0.65M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -dun MMA medioan konidiak sor zitzaketen transformanteak bigarren plaka selektiboetara transferitu ziren. Kontrol moduan, medio ez-selektiboan ere inokulatu ziren, izan ere selektio presioa kentzearekin batera anduiak plasmidoa kanporatzera joko zuen eta, ondorioz, FLIP mutantearen berezko *fluffy* fenotipoa behatu beharko litzateke.

## 6. DNA erauzketa eta manipulazioa *Aspergillus nidulans*-en laginetatik.

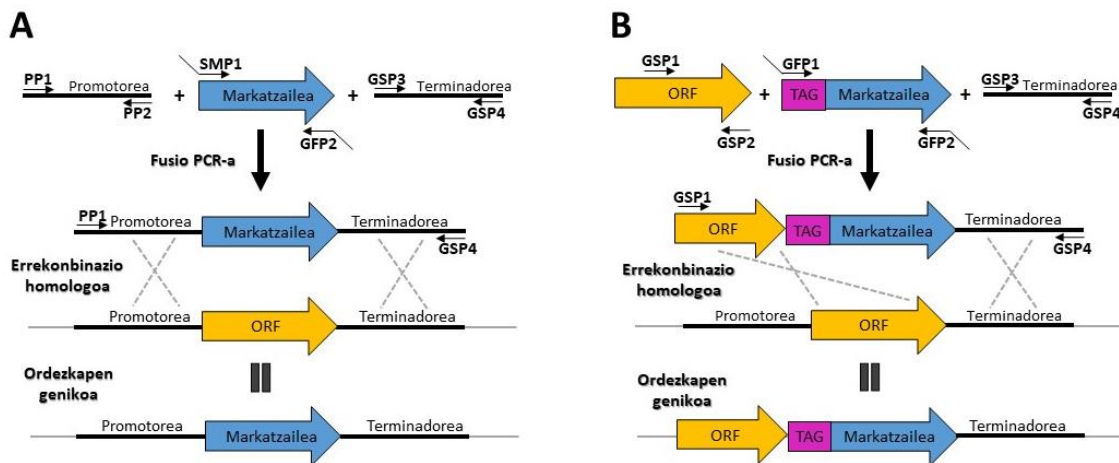
### 6.1. *A. nidulans*-en gene delezio eta etiketatzea.

*A. nidulans*-en genomatik gene bat ezabatu edo proteina jakin bat kodetzen duen genea etiketatzeko, Yang eta lagunek garatutako fusio-PCR protokoloa jarraitu zen (Yang *et al.*, 2004). Eraikitako DNA molekula sintetikoek *A. nidulans*-en protoplastoak transformatu ziren, aurrez 5. atalean azaldu bezala. Geneen ezabaketaren kasuan, ezabatu nahi den genearen promotorea (5'-UTR eremua; 1.5kb inguru) eta terminadorea (3'-UTR eremua; 1.5kb inguru) anplifikatu ziren

## 2. KAPITULUA:

PCR banatan, DNA genomikoa erabiliz molde bezala eta PP1/PP2 edo GSP3/GSP4 oligonukleotido pareak, hurrenez hurren, hastarazle bezala (2.2A irudia).

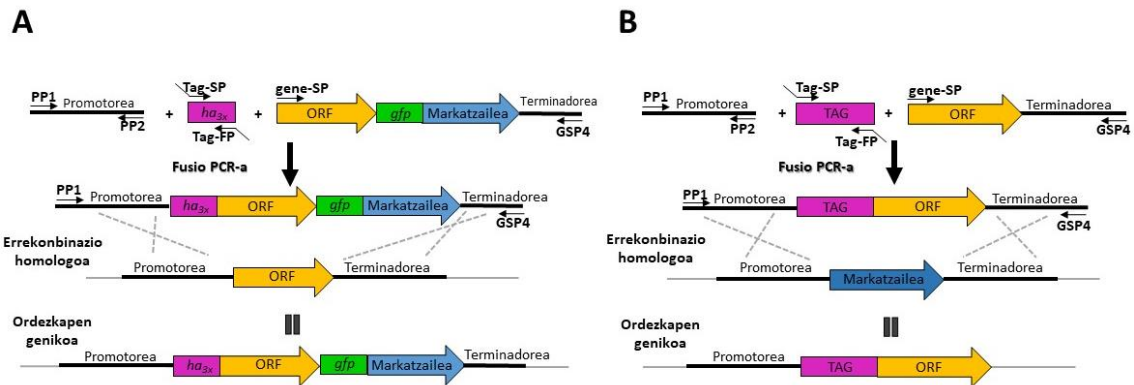
Beste aldetik, ezabatutako genea ordezkatzeko zuen selekzio markatzailea amplifikatu zen hirugarren PCR erreakzio batean, kasu honetan markatzaile hori bere barnean zuen plasmidoa erabiliz molde bezala. Markatzaileak, alde banatan, promotorearen amaierarekiko eta terminadorearen hasierarekiko berdinak ziren zatiak izango zituen, horretarako SMP1/GFP2 oligonukleotidoak erabili zirelarik. Ertz horiek izateak, promotore eta terminadorearekiko fusioa ahalbidetuko zuen laugarren PCR erreakzioan, fusio-PCRa alegia (2.2A irudia).



**2.2. irudia: Fusio-PCR prozedura geneak ezabatu edo etiketatzeko.** A) Geneen deleziorako DNA *cassette*-en sintesia. DNA konstrukzioa eraikitzeo lehenik ondoko fragmentuak amplifikatu ziren, bakoitza PCR erreakzio banatan: promotorea (PP1-PP2 oligonukleotidoez eta DNA genomikoa erabiliz molde bezala), selekzio markatzailea, gezi urdinez irudikatua (SMP1-GFP2 oligonukleotidoez eta plasmido egokia erabiliz molde bezala; Ikus 1.3 atala kapitulu honetan) eta terminadorea (GSP3-GSP4 oligonukleotidoez eta, berriz ere, DNA genomikoa erabiliz molde bezala). SMP1 eta GFP2 oligonukleotidoek promotorearekiko eta terminadorearekiko osagarriak ziren isatsak zeramatzaten, hurrenez hurren, azken PCR batean hiru fragmentuen fusioa ahalbidetuko zutenak. Fusio-PCR-rako ertzetako PP1 eta GSP4 oligonukleotidoak erabili ziren. Transformazioan, lortutako PCR produktuaren errekonbinazioz, selekzio markatzaileak ezabatu nahi den genea (gezi horia) ordezkatzeko zuen, genearen mutante nuloak lortuz. B) Geneen etiketaztea 3' ertzean. PCR erreakzio banatan honakoak amplifikatuko ziren. Lehenik, etiketatu nahi zen genearen 1.5kb inguruko 3' eremua amplifikatu zen (stop kodoia barne hartzen ez zuena), GSP1 eta GSP2 oligonukleotidoez eta DNA genomikoa erabiliz molde bezala. Bigarrenik, intereseko genea etiketatuko zuen epitopoa (lauki lilaz adierazia, TAG: HA<sub>3x</sub>, GFP, mRFP edo mCherry) eta selekzio markatzailea zituen PCR produktua, GFP1 eta GFP2 oligonukleotidoez eta plasmido egokia erabiliz. Hirugarrenik, eta A atalean azaldu bezala, terminadorea amplifikatuko zen. Azkenik, GSP1 eta GSP4 hastarazleez, hiru fragmentuak fusionatu ziren. Kasu honetan, errekonbinazio homologoz jatorrizko genea forma etiketatuaz ordezkatzeko zuen, selekzio markatzailearen eraginez.

Proteinak epitopo batez (TAG 2.2B irudian; GFP, HA<sub>3x</sub>, mRFP edo mCherry) etiketatzeko jarraitutako PCR estrategiak zenbait aldaera ditu aurrekoarekiko. Karboxil muturra etiketatzea helburu zenean, berriz ere, hiru DNA fragmentu amplifikatuko ziren: lehenik, genearen 3' eremuko 1.5kb inguru DNA genomikoa erabiliz molde bezala eta GSP1/GSP2 oligonukleotido pareta hastarazle bezala. Bigarrenik, etiketa bezala erabili nahi zen epitopoa kodetzen zuen DNA eta selekzio-markatzailea zuen zatia, plasmido egokia erabiliz molde bezala (1.3 atala kapitulu honetan) eta GFP1/GFP2 oligonukleotido pareta hastarazle bezala. Azkenik, terminadorea, aurreko kasuan azaldutako modu berean. Hiru fragmentoak elkartzeko fusio-PCRan GSP1 eta GSP4 hastarazleak erabili ziren.

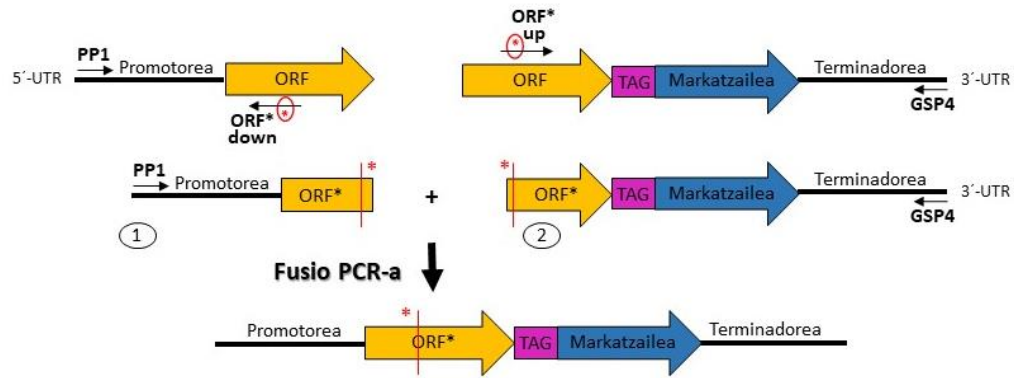
Zenbait kasutan proteinaren amino muturra etiketatu nahi izan zen eta horretarako bi bide jorratu ziren (2.3. irudia). Lehen kasuan, nahiz eta epitopoa kodetzen zuen sekuentzia genearen 5' muturrean elkartu, markatzailea 3' aldean mantendu zen. Honela eraiki zen *ha<sub>3x</sub>::flbD::gfp::pyrG* konstrukzioa, FlbD etiketa bikoiztun anduia sortzeko aukera eman zuena. Horretarako, 1) promotorea (PP1/PP2 hastarazleak eta DNA genomikoa molde bezala), 2) HA<sub>3x</sub> etiketa kodetzen duen sekuentzia (Tag-SP/Tag-FP hastarazleak eta plasmido egokia molde bezala) eta 3) genea, *gfp* eta selekzio markatzailearekin batera (3' eremuan) (gene-SP eta GSP4 hastarazleak eta *flbD::gfp::pyrG* andui baten DNA genomikoa molde bezala) amplifikatu eta fusionatu ziren (2.3A irudia). Bigarren prozeduran, 5.3. atalean azaldu bezala eta FOA-ren erabileraren eraginez, aurrez genomari integratu zen *pyrG* selekzio markatzailea bera ordezkatzeko sortutako DNA *cassette*-arekin. Transformaziorako 5'-UTR::TAG::ORF::3'-UTR *cassette*-a eraiki zen 2.3B irudian azaltzen ziren fragmentoetatik abiatuz eta adierazten diren hastarazle pareak erabiliz kasu bakoitzean. Estrategia hori jarraituz sortu ziren ondoko kimerak adierazten zituzten anduiak: HA<sub>3x</sub>::FlbD; GFP::FlbD edo GFP::FlbB<sup>(L333A,L334A)</sup>.



**2.3. irudia: Proteinak amino ertzean etiketatu ahal izateko fusio-PCR prozedurak.** A) Geneen etiketatzea 5´ ertzean selekzio markatzailea genearen 3´ ertzean mantenduz. Hiru erreakzioetan, ondoko PCR produktuak anplifikatu ziren: promotorea (PP1-PP2 hastarazleez), epitopoa (lauki lilaz irudikatua, tag-SP eta tag-FP oligonukleotidoez) eta *gfp* eta selekzio markatzailea 3´ ertzera lotuta dituen genea bera (gene-SP eta GSP4 oligonukleotidoez). Anplifikatutako fragmentuak fusio PCRz fusionatu ziren PP1 eta GSP4 oligonukleotidoez. Transformazioan gene basatia etiketadun molekula sintetikoaz ordezkatuko da. B) Selekzio-markatzaile gabeko DNA *cassette*-aren sintesia. Kasurako, etiketa kodetzen duen sekuentzia genearen 5´ muturrean txertatzeko helburuz ondoko fragmentuak anplifikatu eta fusionatuko ziren: promotorea (PP1-PP2 oligonukleotidoez), epitopoa (tag-SP eta tag-FP oligonukleotidoez) eta etiketatu nahi den genea terminadoreaz batera (gene-SP eta GSP4 oligonukleotidoez). Transformazioa burutu ahal izateko, DNA *cassette*-a txertatu nahi dugun *locus*-ean *pyrG* markatzailea behar dugu aurrez, FOA-rekin selekzio bidea edukitzeko. Errekonbinazioz *cassette*-ak *pyrG*-ren lekua hartuko du, eta FOA duen MMR medioan transformanteak bereizi ahalko dira (5.3. atala).

## 6.2. Zuzendutako mutagenesia.

Mutazio jakin eta zehatz bat zuten anduiak sortu ahal izateko, mutazio hori zuten oligonukleotido egokiak diseinatu eta erabili ziren. Fusio-PCR teknika bera oinarri hartuta, mutatu nahi zen genearen aldaera basatia molde gisa baliatu zen mutaziodun fragmentuak anplifikatzeko (2.4. irudia). Alde batetik, PP1 eta ORF\*-down hastarazleez mutazioaren kokagunetik 5´ aldeko eremua anplifikatu zen (2.4. irudian 1 fragmentua). Eta bestetik, ORF\*-up eta GSP4 oligonukleotidoez genearen gainerako eremu kodifikantea (2.4. irudian 2 fragmentua). ORF\*-up/down oligonukleotidoak elkarrekiko osagarriak ziren. Transformazio estrategiaren baitan selekzio-markatzaile nahiz epitopoa ere anplifikatuko ziren (kasu horietan, mutatutako genea aurrez markatzaile egokiaz etiketatua zuen anduiaren DNA genomikoa erabiliko zen moldetzat). Oligonukleotidoetan txertatutako mutazioak fragmentu berrietan eta, ondorioz, fusio produktuan ere agertuko ziren.



**2.4. irudia: Zuzendutako mutagenesi prozedura.** Fusio-PCR estrategian oinarrituz mutazio espezifiko bat gene batean txertatzeko jarraitu zen prozedura erakusten da. Horretarako, oligonukleotido egokiak diseinatu ziren, elkarrekiko konplementario zirenak, eta txertatu nahi den mutazioa barne hartzen zutenak (erdialdean kokatua). Mutatu nahi zen genearen DNA basatia molde gisa erabilia ondorengo PCR produktuak anplifikatu ziren: 1) PP1 eta ORF\*-down oligonukleotidoez genearen 5' eremua eta 2) ORF\*-up eta GSP4 oligonukleotidoak erabiliz gainerako eremu kodifikantea (hala behar zenean etiketaz eta selekzio markatzaileaz batera, irudian erakusten den bezala). Anplifikatutako fragmentuek diseinatutako mutazioa izango zuten, bai eta horien fusioaz lortuko zen transformaziorako DNA *cassette*-ak ere.

#### 6.2.1. FlbE::FlbB kimerak adierazten dituzten *A. nidulans*-en anduien sorrera.

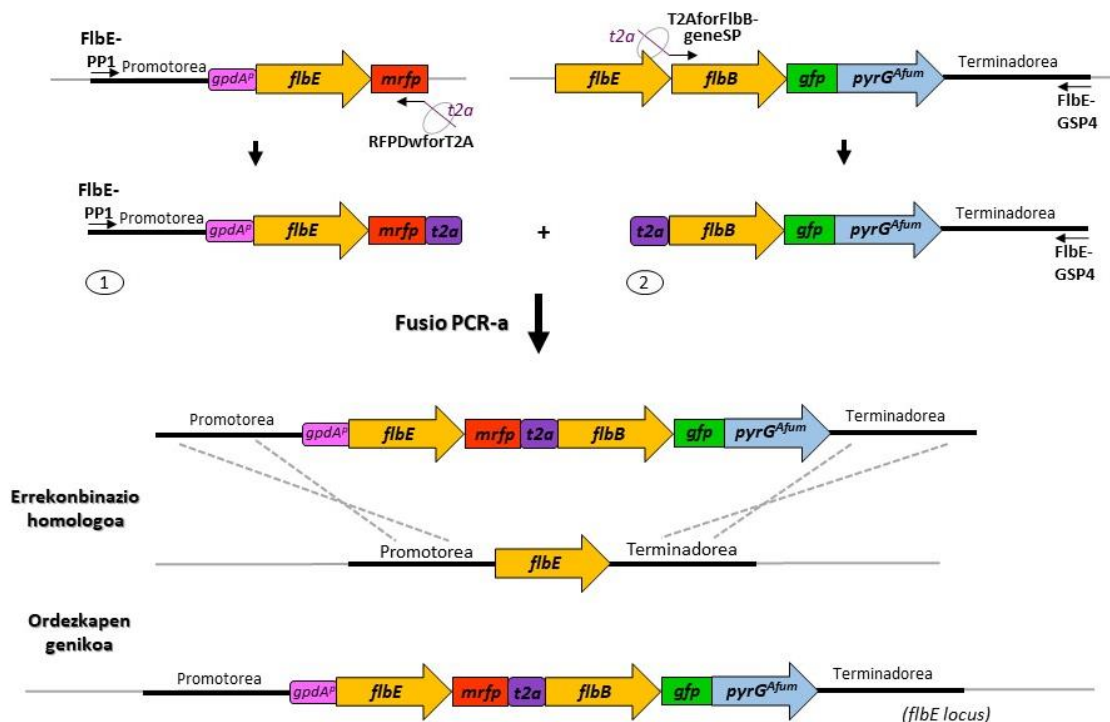
Laugarren kapituluaren aipatzen diren FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP kimera nahiz FlbE::mRFP::T2A<sup>G17A</sup>::FlbB::GFP forma mutantea espresatzen duten anduiak sortzeko, *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::(t2a)::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* eta *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::(t2a\*)::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* DNA molekula sintetikoak eraiki behar izan ziren. Horretarako, fusio-PCR estrategia konplexuagoa burutu zen, 2.5. irudian jasotzen den bezala. Erabiliko ziren oligonukleotido espezifikoek T2A peptido biralari (EGRGSLTCDVEENPGP) nahiz bere T2A\* aldaera mutanteari (EGRGSLTCDVEENPP) zegokien DNA sekuentziak isats moduan atxikita zituzten.

PCR erreakzio desberdinetan bi fragmentu anplifikatu ziren aurrez eskura ziren andui errekonbinanteen DNA genomikoa molde gisa erabilia. Lehenik, FlbE::mRFP kimera konstitutiboki (*gpdA<sup>P</sup>* promotorepean) adierazten zuen anduiaren DNA-tik abiatuz, *gpdA::flbE::mrfp::t2a* fragmentua anplifikatu zen (1 zenbakiarekin 2.5. irudian). Horretarako, FlbE-PP1 eta RFPDwforT2A oligonukleotidoak erabili ziren. T2A-ren aldaera mutanterako ere (*gpdA::flbE::mrfp::t2a\**) estrategia bera erabili zen, kasurako PP1 eta RFPDwforT2A\*

## 2. KAPITULUA:

oligonukleotidoak erabiliz. Bigarren fragmentua,  $t2a::flbB::gfp::pyrG^{Afum}$  edo  $t2a^*::flbB::gfp::pyrG^{Afum}$ , PCR bidez anplifikatzeko aurrez Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoreak sortutako  $flbE::flbB::gfp::pyrG$  ( $flbE$ -ren *locus*-ean integratua) anduiaren DNA genomikoa hartu zen oinarri (2 zenbakia 2.5. irudian). Oligonukleotidoei dagokienez, T2AforFlbB-geneSP eta FlbE-GSP4 parea, eta mutantearen kasuan T2A\*forFlbB-geneSP eta FlbE-GSP4 parea, erabili ziren. Bi fragmentuen tamainak elektroforesiaz egiaztatu ostean, fusio-PCRa burutu zen. Fusioa ahalbidetuko zuten zati osagarriak  $t2a$  edo  $t2a^*$  sekuentziak ziren, eta beraz, fusio-PCR produktuek barne hartuko zuten  $t2a$  edo  $t2a^*$  eremua,  $flbE::mrfp$  eta  $flbB::gfp::pyrG^{Afum}$  sekuentzien artean txertatuta.

Sortutako konstrukzio genomikoez  $\Delta flbB$  anduiaren protoplastoak transformatu ziren; honela, FlbB proteinaren iturri bakarra txertatutako kimeretatik zetozenak izatea ziurtatuko zen. Errekonbinazio homologoz,  $gpdA^p::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp::pyrG^{Afum}$  edo  $gpdA^p::flbE::mrfp::t2a^*::flbB::gfp::pyrG^{Afum}$  konstrukzioak  $flbE$  *locus*-an txertarazi ziren. Ondorioz, FlbE-ren adierazpena ere txertatutako konstrukziotatik letorke soilik.



2.5. irudia: *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::(t2a/t2a\*)::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* konstrukzioaren sintesia. PCR teknikaren bitartez *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::(t2a/t2a\*)* eta *(t2a/t2a\*)::flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* fragmentuak anplifikatu ziren aurrez sortuak zeuden beste andui jakinen DNA genomikotik abiatuz. PP1 eta RFPDwforT2A (edo RFPDwforT2A\*) oligonukleotido pareak, batetik, eta T2AforFlbB-geneSP (edo T2A\*forFlbB-geneSP) eta FlbE-GSP4 pareak bestetik, erabili ziren hastarazle bezala. RFPDwforT2A eta T2AforFlbB-geneSP oligonukleotidoek 5' ertzean *t2a* sekuentzia zeramaten eta, honi esker, anplifikatutako fragmentuek ere eremu hori izango zuten, 3' ertzean lehenak eta 5' ertzean bigarrenak. Bi fragmentuen fusioak, *t2a* eremuen bidez, sekuentzia birala fusio produktuan txertatzea egiten du posible, *flbE::mrfp* eta *flbB::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* sekuentzien artean, hain zuzen ere. Transformazioan, eraikitako konstrukzioak *flbE locus*-ean errekonbinatu ziren, jatorrizko *flbE*-ren ordean.

### 6.3. Gene baten ausazko mutagenesia.

*flbD* genearen ausazko mutagenesia burutzeko fusio-PCR teknikan oinarrituriko estrategia jarraitu zen. Akatsen aktibitate zuzentzailea (*proofreading*) ez duen DNA polimerasa bat erabiliz, *flbD* genea anplifikatu zen. Polimerasaren fidelitate baxuaren ondorioz, anplifikazioan akatsak gertatzen ziren, ausaz mutaturako sekuentzia genikoak lortuz. Gainerako PCR fragmentuak, promotorea eta *gfp::pyrG<sup>Afum</sup>::flbD(5'-UTR)*, *proofreading* aktibitate-dun polimerasa batez anplifikatu ziren. Hiru fragmentoak fusionatu ondoren, ausaz mutaturako *flbD*-ren konstrukzio genikoez andui egokiaren protoplastoak transformatu eta hainbat transformante isolatu eta aztertu ziren. Fenotipo edo ezaugarri bereizgarria zuten transformanteak aukeratu ziren eta horien DNA genomikoa molde bezala erabiliz, *flbD locus*-a anplifikatu eta sekuentziatu zitzairen, fenotipo desberdin hori zein mutazioek eragiten zuen ezagutzeko.

### 6.4. DNA erauzketa.

Aztertu nahi ziren anduien konidioak, beharrezko ziren elikagai osagarri guztiak zituen 25mL MMA medio likidoan hazten jartzen ziren 100mL-ko erlenmeyer-etan. Kulturak 16 orduz mantendu ziren 37°C-tan eta 220rpm-tako agitazioaz. Jarraian, hazitako andui bakoitzaren lagin

## 2. KAPITULUA:

---

bana Miracloth™ paperean filtratu eta laginak liofilizatuak izan ziren. Ondoren, mizelioak txikitu eta DNA genomikoa erazteko ohiko prozedurari ekin zitzaion. Mizelioa Tris pH=8-tan 25mM, sakarosatan 0.25M eta EDTA-n 20mM zen disoluzio baten 1mL-tan erresuspenditu zen, ondoren 100µL %10 SDS gehituz.

Mizelio suspentsioa 15 minutuz 65°C-tan inkubatzen eduki ohi zen zelulen lisia gerta zedin. Jarraian, DNAREN erazketa burutzeko, nahasteei fenol/SEVAG (fenol/kloroformo/alkohol isoamilikoa, 25:24:1 proportzioan) 1mL gehitzen zitzaion, eta 5 minutuz nahasten ziren. Zentrifugazioz (5', 4000rpm) fase organikoa eta ur fasea banatzen ziren, eta fase organikoa jasotzen zen hodi berrietan, bertan aurkitzen baitzen DNA. Fenolaz bigarren aldiz errepikatzen zen erazketa urratsa. Ondoren, DNA-ren beharrezko garbiketak burutzen ziren. Lehenik, erazutako bolumenaren hamarrena sodio azetato 3M (pH=6) eta hiru bosten isopropanolaz DNA hauspeatzen zen. Bigarrenik, hauspeakinak, etanolean %80 zen ur disoluzioaz garbitzen ziren. DNA ur ultrapuruaren (miliQ H<sub>2</sub>O) 300µL-tan erresuspenditu eta RNAasa (*DNase free*) entzimaz 37°C-tan 30-60 minutuz inkubatu ziren laginak RNA hondarrak ezabatzearren. Ondoren, DNA laginak berriro ere sodio azetatoa eta isopropanolaz hauspeatu eta etanolaz garbitzen ziren. Azkenik, erazutako DNA laginak 200µL miliQ uretan erresuspenditzen ziren.

Behin erazketa protokoloarekin amaituta, prozesua egoki eman zela eta DNA genomikoa eskuratu zela egiaztatzeko agarosa gelean (%0.8 p/v) lagin bakoitzaren alikuota baten elektroforesia burutu zen. Erazketa ontzat emateko *A. nidulans* onddoaren genomari legokiokeen banda bat agertu beharko zukeen elektroforesi irudian 23Kb-ko altueran.

Erazketarako beharrezko zen fenol/SEVAG nahastea osatzeko, aurrez fenol organikoa prestatzen zen. Horretarako 250mg fenol kristalak ur bainuan 68°C-tara urtzen ziren eta hidroxikinolona (%0.1) gehitzen zen. Tris-HCl disoluzioez fenolaren pH-a egokitu behar zen. Lehen txandan, 250mL Tris-HCl 0.5M (pH=8) gehitu eta 15 minutuz giro tenperaturan irabiatzen eduki ostean, nahastea dekantatzen uzten zen bi faseak bereizi zitezten. Fase organikoaz



jarraituz, beste 250mL Tris-HCl 0.1M (pH=8) gehitu ziren, berriro ere nahaste eta dekantatze prozedura bera jarraituz. Tris-HCl 0.1M disoluzioaz urrats bera behar bestetan errepikatuko zen fase akuosoaren pH-a 8ra iritsi arte. Azkenik pH egokia lortuta, fase organikoari 50mL Tris-HCl 0.1M (pH=8) gehitu eta 4°C-tan argitik babestuta gorde zen.

#### 6.5. DNA-ren detekzioa zunda luminiszente bidez (Southern-blot).

*Southern-blot* teknikaz, transformazio desberdinetan lortutako transformanteen genomatan insertoaren errekonbinazioa zegokion lekuan, era homologoan alegia, ematen zela egiaztatzen zen. *Southern-blot*-a aurrera eramateko DIG-High Prime DNA Labeling eta Detection Starter KitII (Roche) kita erabili zen. Beharrezko disoluzioak 2.7. taulan jasotzen dira.

#### 2.7. Taula: *Southern-blot* prozeduran erabilitako disoluzioak.

| Disoluzioak                 | Prestaketa (1L prestatzeko)  |
|-----------------------------|--|
| Desnaturalizazio disoluzioa | 87.66g NaCl (1.5M)<br>20.00g NaOH (0.5M)   |
| Neutralizazio disoluzioa    | 60.59g Trizma basea (0.5M)<br>175.3g NaCl (3M)<br>HCl-z pH=7-ra doitu  |
| SSC 20x                     | 175.3g NaCl (3M)<br>88.22g sodio zitratoa (300mM)  |
| Church disoluzioa           | (100mL prestatzeko)<br>1.0g behi seroalbumina (BSA)<br>50mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M (pH=7)<br>200µL 0.5M EDTA (pH=8)<br>35mL SDS %20 (p/v) |
| Garbiketa disoluzioa        | 11.6g azido maleikoa (0.1M)<br>8.77g NaCl (0.15M)<br>3mL TWEEN®20 (%0.3 v/v) (Acros Organics)<br>NaOH solidoaz pH=7-ra doitu   |
| Azido maleikoa              | 11.6g azido maleikoa (0.1M)<br>8.77g NaCl (0.15M)<br>NaOH solidoaz pH=7-ra doitu   |
| Detekzio disoluzioa         | 12.11g Trizma basea (0.1M)<br>5.80g NaCl (0.1M)<br>NaOH solidoaz pH=9.5-ra doitu   |

## 2. KAPITULUA:

---

Hasteko, aztertu nahi ziren transformanteen eta jatorrizko parentalaren DNA genomikoak erauzi ziren, 6.4. puntuan azaldu bezala, jarraian errestrikzio entzima batez digeritu ahal izateko. Andui parental eta transformanteetan manipulatu zen *locus*-ak zuen antolaketa desberdintzeko aukera ematen zuen errestrikzio entzima eta zunda egokiak aukeratzen ziren. Errestrikzio entzimaren aukeraketak, lortuko ziren DNA fragmentuak tamainaren baitan desberdintzeko bidea eman behar zuen. Digeritutako DNA zatien banaketarako, laginen elektroforesia egin zen %0.8 (p/v) agarosa gelean. Ondoren, gela UV argiaz erradiatu zen 10 minutuz (320nm, Vilber Lourmat). Segidan, 45 minutuz desnaturalizazio disoluzioan eduki zen agitazioaz, DNA-ren desnaturalizazioa eman zedin. Izan ere, DNA-k desnaturalizatuta behar du ondorengo urratsetan zunda hibrida dadin. Neutralizazio disoluzioaz bi garbiketa burutu ziren, 30 minutukoa bakoitza, eta DNA-ren transferentziari ekin zitzaion positiboki kargatutako nylon mintz batera (ZetaProbe® blotting, BioRad). Transferentzia kapilaritatez gauzatzen zen, non SSC (20x) soluzioak indar eragilea sortzen zuen DNA geletik mintzara bultzatzeko (Sambrook *et al.*, 1989).

Transferentziaren ostean DNA mintzera finkatu zen, UV argiaz (Vilber Lourmat BLX-E254, 254 nm) 120mJ-ko bi pulsu emanez. Aurre-hibridaziorako, mintza hibridazio hodi batean sartu eta Church disoluzioaz (Church eta Gilbert, 1984), 2.5 orduz inkubatu zen 42°C-tan. Ondoren, aurrez 95°C-tan 5 minutuz desnaturalizatutako zunda egokia gehitu eta 15 orduz eduki zen mintza hibridatzen 42°C-tan. Zunda, identifikatu nahi den eremuarekiko osagarria den DNA zati espezifikoa zen, luminiszentzia emititzeko gai den digoxigenina-dUTP nukleotidoaz markatua. Aurrez, zunda prestatzeko, 1.5mL-ko hodi batean, 16µL DNA 10 minutuz desnaturalizatu ziren 95°C-tan. Eta 5 minutu izotzetan eduki ostean, 4µL digoxigenina-dUTP disoluzio (DIG-High Prime, Roche) gehitu zitzaizkion. Nahastea 37°C-tan 16 orduz inkubatzen eduki zen. Azkenik, erreakzioa inaktibatzeko, 2µL EDTA (0.2M, pH=8) gehitu eta 65°C-tan 10 minutuz berotu zen.

Hibridazioa burututa, 5 minutuko bi garbiketa egin ziren SSC (2x) + SDS (%0.1 p/v) nahasteaz, garbiketa bakoitzeko disoluzioa berriztaten zelarik. Bi garbiketa gehiago egin ziren SSC (0.5x) + SDS (%0.1p/v) disoluzioaz, bakoitza 65-68°C-tan berotuz 15 minutuz. Azkenik, beste bi garbiketa burutu ziren garbiketa disoluzioaz (*washing* delakoaz), giro tenperaturan eta 5 minutuz. Garbiketen ostean mintza *blocking* disoluzioaz (kitak dakarren 10x den *blocking* disoluzioaren 4mL, azido maleikoaren disoluzioaren 36mL-rekin diluituz lortzen dena) inkubatzen eduki zen 30 minutuz agitazio birakariaz. Honen ostean, gehitutako *blocking* disoluzioaren 20mL-ri 2µL anti-digoxigenina-AP (1/10000 diluzioa, 75mU/mL, Roche) batu zitzaizkien eta beste 30 minutuz inkubatu zen mintza bertan. Ondoren, 15 minutuko bi garbiketa egin ziren garbiketa disoluzioaz eta, azkenik, detekzio disoluzioaz 5 minutu inkubatzen zen mintza. Honarteko garbiketa eta detekzio urratsak agitazio birakariaz burutu ziren hibridazio labean (ProBlot, LabNet). Detekzioari bide emango zion kimioluminiszentzia erreakzioa eragiteko, mintza hoditik atera eta, gainazalean, kitak dakarren CSDP (Roche) disoluziotik 1mL zabaldu ziren, 5 minutuz utziz. Mintza lehortu eta luminiszentzia hobetzeko beste 10 minutuz 37°C-tan inkubatu zen. Azkenik, luminiszentzia detektatzeko, mintza ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad) gailuan aztertu zen.

## 7. Genetika klasikoko teknikak.

Genetika klasikoko teknikak baliatu ziren bai andui berriak sortzeko bai eta FLIP166 mutazioaren azterketa kromosomikoa aurrera eramateko. Genotipo jakineko bi anduiren gurutzapen meiotikoan oinarriturik (Todd *et al.*, 2007a; Todd *et al.*, 2007b), konbinazio genetiko desberdineko hainbat andui berri sortu zen.

Heterokarioiak lortzeko, gurutzatu nahi ziren anduiak elkar tartekatuz eta bata bestetik 5-10mm-ra inokulatu ziren, bi parentalek behar zituzten elikagai osagarri guztiez prestatutako hazkuntza medioan. Plakak 37°C-tan 48 orduz hazi ostean, andui parentalen hifak elkar

## 2. KAPITULUA:

---

fusionatzera iritsi ziren zonalde periferikoak moztu eta medio selektiboko plaketara transferitu ziren. Medio selektiboan ez ziren andui parentalen auxotrofia elikagai osagarriak gehitzen, beti ere bi parentalek auxotrofia bera partekatzen ez bazuten. Presio selektibo honi esker, heterokarioien eraketa bultzatzen zen, koloniaren bat garatuko bazen bi parentaletatik eratorritako informazio genetikoa behar baitzuen. Plakak 7-8 egunez 37°C-tan eduki ziren heterokarioiak hauteman artean. Eratu ziren heterokarioak isolatu nahian, horien hifa eremuak medio selektiboko plaka berritara transferitu eta hazten utzi ziren. Jarraian, gurutzatutako anduien nahiz helburuaren baitan, heterokarioiez jorratu zitezkeen bide desberdinak azaltzen dira.

### 7.1. Gurutzapen meiotikoa.

Genotipo jakineko andui berriak lortzeko nahiz azterketa kromosomikorako jarraitu zen ondoko prozedura. Heterokarioietan garapen sexuala induzitu zen bi parentalen informazio genetikoaren konbinaketa ezberdinak izango zituzten askosporak eskuratzeko. Horretarako, heterokariodun plakak parafilmaz itxi ziren, egoera anaerobioan kleistotezioen (egitura sexualen) eraketa bultzatzen baita. Bi aste ingurura, kleistotezioen eraketa ziurtatu ostean, horien isolamenduari ekin zitzaion. Horretarako, hazkuntza medio solidodun plaka batean kleistotezioak bereizi eta garbitu ziren, jarraian kleistotezio bakanduetatik bat hartu eta aurrez esterilizatutako 300µL H<sub>2</sub>O zituen hodi batera eraman zelarik. Metalezko hagatxo baten laguntzaz kleistotezioa apurtu eta askosporak uretan diluitu ziren. Prozedura bera errepikatu zen behar adina alditan, gurutzapen bakoitzetik 5-10 kleistotezio bitartean isolatuz. Hautagai egokia identifikatzeko, kleistotezio hautagai bakoitzetik lagin bana hartu eta askosporak MCA medio ez-selektibotan zabaldu ziren, askospora horiek bi parentalen fenotipoen konbinaketa guztiak izan zitzaketela baieztatzeko. Baldintza hori betetzen zituzten kleistotezioak gordeko ziren balekotzat.

Konbinazio genetiko desberdinetako ondorengoak eskuratzeko, aukeratutako kleistotezioetako askospora diluzioak MCA medio ez-selektibodun plaketan haziko ziren. Horien artean, genotipo egokikoak identifikatu eta isolatzeko tresna desberdinak erabili ziren, nagusiki ondorengo desberdinak parentalek behar zituzten elikagai osagarri guztietatik aldiro bana faltan zuten kultura mediotan haztea. Horiekin batera, eta behar izatekotan, *southern-blot*-a (6.5 sekzioa), *western-blot*-a (9.3 sekzioa), fluoreszentsia mikroskopia (10. sekzioa) edo mutazio jakinen sekuentziazioa ere burutu ziren.

## 7.2. Diploideen eraketa eta haploidizazioa.

Doktorego tesi honetan zehar hainbat diploide ere sortu ziren, bai FLIP mutazioen izaera gainartzailea edo azpirakorra ezagutzeko bai eta FLIP166 anduiaren fenotipoa eragiten zuen mutazioaren kokapen kromosomikoa ezagutzeko. Bestalde, *nsdD1; gfp::flbB* anduiaren sorrera ere (*nsdD1* mutazioaren ondorioz garapen sexuala kaltetua dago) diploide batetik abiatu zen.

Behin heterokarioia lorturik, honen esporak Tween®20 (%0.02 v/v)-tan bildu ziren eta gogorki nahastu ziren *vortex*-az. Nahastearen bolumen desberdinak MMA medio selektiboko plaketan inokulatu ziren. Medio selektiboa izaki, heterokarioiak edo diploideak soilik hazi ahalko liriateke bertan. Bi-hiru egunez 37°C-tan inkubatu ondoren, eta haien fenotipoan oinarrituta, diploideak isolatu ziren.

- 7.2.1. Azpirakortasun test-a.

Dominantzia proba mutazio jakin bat gainartzailea edo azpirakorra den iragartzeko baliatzen da. Horretarako, mutazioa daraman anduia eta andui basati baten artean osatutako diploidearen fenotipoa aztertzen da. Azpirakortasun probaren arabera, diploidearen fenotipoa

## 2. KAPITULUA:

---

jatorrizko mutantearen berdin bada, mutazioa gainartzailea dela onartzen da. Aldiz, diploideak andui basatiaren fenotipoa badu, mutazioa azpirakortzat jotzen da.

- 7.2.2. Haploidizazioa.

Diploideen haploidizazioa eragiteko benomiloa erabili zen, izan ere, produktu honek, mitosiaren baitan, kromosomen banaketan parte hartzen duten mikrotubuloei eragiten die, eta ondorioz, kromosomen segregazio egokia oztopatzen du. Benomilo kontzentrazio desberdinak erabili ziren (1-3µg/mL) parentalek behar zituzten elikagai osagarri guztiak zituen MCA medioan (ez-selektiboa). Era honetan, genotipo konbinaketa posible guztiak izan zitzaizkiren haploideak hazi ahal izango ziren. Benomilodun plakak 5-6 egunez 37°C-tan eduki ostean, sektore moduan bereizitako koloniak isolatu ziren, berriz ere MCA ez-selektiboan, haploideak zirelakoan.

### 7.3. FLIP166-ren mutazioa dagoen kromosomaren identifikazioa analisi genetikoaz.

FLIP166-ren fenotipoa eragiten zuen mutazioa edo mutazioak zein kromosomatan aurkitzen ziren identifikatzeko burutu zen honako genetika klasikoko proba (Todd *et al.*, 2007a). Aztergai zen FLIP166 anduia erreferentziako FGSCA68 eta FGSCA283 anduiez (*Fungal Genetics Stock Center*; [www.fgsc.net](http://www.fgsc.net)) gurutzatu zen, 7. atal honen hasieran azaldu bezala. Erreferentziako anduiek *A. nidulans* onddoaren 8 kromosometako bakoitzean selekzio markatzaile bat dute, markatzaile auxotrofikoa (gehitu beharreko elikagaia gabe onddoa ezin da hazi) edo erresistentzia markatzailea (onddoa konposatu toxikoaren aurrean erresistente egiten duena) izan daitezkeenak. Ugalketa sexualaren bitartez (7.1 puntua) edo diploideen haploidizazioz isolatutako haploideen (7.2 puntua) bitartez bi anduien kromosomen konbinaketa desberdinak dituzten ondorengo haploideak lortzen dira. FLIP mutazioa zeramaten hautagaiak bereizteko 0.65M fosfatodun medioan fenotipo akonidiala zuten hainbat ondorengo/haploide hazi eta isolatu ziren medio ez selektiboan. Kasu honetan, FLIP fenotipoa

zuten lehen belaunaldiko ondorengoek FLIP166 mutazioa aurkitzen zen kromosomaren aldaera zeramaten eta ez zuten, ondorioz, kromosoma horri zegokion selekzio markatzailea izango (beti ere errekonbinazio genetikorik eman ez bada). Selekzio markatzaileen laguntzaz mutazioaren lokalizazio kromosomikoa identifikatu nahi zen.

Horretarako, selekzio markadoreen proba burutu zen. FLIP fenotipodun lehen belaunaldiko kolonia bakoitza MMA medio ez-selektiboz prestatutako hainbat Petri plakatan inokulatu zen. Plaka horiek andui parentalek behar zituzten elikagai guztiak zituzten baina, txanda bakoitzean, erreferentziako anduiaren kromosoma bakoitzeko markatzailearen arabera, elikagai osagarri bat kendu (auxotrofiaren kasuan) edo konposatu toxiko bat (erresistentzia-markatzaileen kasuan) gehitzen zen. Inokulatu eta 72 orduz behatu zen ea koloniak hazteko gai ziren. FLIP fenotipodun kolonia guztiek mutazioa aurkitzen zen kromosomari zegokion selekzio medioan portaera amankomuna aurkeztu beharko zuketena (errekonbinaketa jasan zuten horiek izan ezik). Alegia, mutazioa daraman kromosoma berean markatzaile auxotrofikoa badago erreferentziako anduiaren, FLIP fenotipodun kolonien %100 hazteko gai behar lukete. Aldiz, erresistentzia markatzailea balego erreferentziako anduiaren kromosoma horretan, FLIP fenotipodun kolonietatik bat bera ere ez litzateke haziko.

## 8. Biologia molekularreko teknikak *Escherichia coli* bakterioaz.

### 8.1. *E. coli* bakterioarentzat hazkuntza medioa.

*E. coli* bakterioa hazteko ohiko LB (Luria-Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989) medioa erabili zen. Hau, 10g/L Bactotripton, 5g/L legamia estraktua eta 10g/L NaCl-z osatuta dago. pH balioa 7.5-ra doitu zen NaOH-ren bitartez eta medio solidoa egin nahi zenean %1 agar gehitzen zen. Medioa osatutakoan, autoklabean 110°C-tan eta 20 minutuz esterilizatu zen. Transformanteen

## 2. KAPITULUA:

---

selekzioa burutzeko anpizilina antibiotikoa gehitu zen LB mediora 100µg/mL-ko kontzentrazioan.

### 8.2. E. coli-ren zelula konpetenteen prestaketa.

Zelula konpetenteen prestaketarekin hasterako, aurrez, 100µL zelula ez-konpetente 900µL LB likidotan diluitu eta nahastearen 100µL inokulatu ziren LB solidodun plaketan. Hurrenez hurreneko bakterioaren alikuotak LB medio solidodun plaketan hirutan berriro ondoren, 2-3 kolonia 250mL-ko Erlenmeyer matrize batean inokulatu ziren 25mL Ψ Broth medioan (%2 (p/v) triptona, %0.5 (p/v) legamia estraktua, 10mM KCl, %0.4 (p/v) MgSO<sub>4</sub>, pH-a 7.6ra doitu zen 0.1M KOH-z eta autoklabearen esterilizatu zen 110°C-tan 20minutuz). Inokuluaren OD<sub>550nm</sub> 0.3 izan arte hazi zen 37°C-tan eta 200 rpm-tan. Jarraian, preinokuluaren 10mL inokulatu ziren 200mL Ψ Broth medio berria zuen 1L-ko matrize batean eta berriz hazten eduki zen OD<sub>550nm</sub> 0.5-era iritsi arte. Medioak inokulatu baino lehen 37 °C-tara berotu ziren.

Kultiboa hoztu zedin matrizea izotzetan sartu zen eta edukia aurrez hoztutako 40mL-ko hodi esteriletan banatu zen. Alikuotak JS-13.1 errotoredun zentrifugan (Avanti® J-E centrifuge) zentrifugatu ziren 8000rpm-tan, 5 minutuz eta 4°C-tan. Hodi bakoitzeko hauspeakina 30mL TfbI medio hotzetan (100mM RbCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, %15 (v/v) glizerola, pH-a 5.8ra doituaz 0.2M azido azetikoaz, filtrazioz esterilizatua eta 4°C-tan gordea) erresuspenditu zen eta berriz ere hodiak 7000rpm-tan, 5 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu ziren. Hodi guztien hauspeakinak 8mL TfbII medio hotzetan elkartu ziren (10 mM MOPS, 10mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, %15 (v/v) glizerola, pH-a 7.0ra doituaz NaOH-z eta filtrazioz esterilizatu ostean 4°C-tan gordea). Azkenik, zelula-konpetenteen 180µL-ko alikuotak prestatu eta -80°C-tan biltegitatu ziren. Alikuota bakoitzak, horrela, bi transformazio nahaste prestatzeko aukera emango luke.



### 8.3. *E. coli* zelula kompetenteen transformazioa.

*E. coli*-ren DH1 edo DH5 $\alpha$  anduien zelula kompetenteak txoke termikoz transformatu ziren. 1.5mL-ko hodi batean zelula kompetente laginaren 90 $\mu$ L eta plasmidoaren 1-2 $\mu$ L batu ziren. Nahastea izotzetan eduki zen 15 minutuz, jarraian 37°C-tan 2 minutuz inkubatu zen eta berriro izotzetan 1 minutu eduki zen txoke termikoa gauzatzeko. Ondoren, 1mL LB likido gehitu ziren hodira eta ordubetez inkubatzen eduki zen 37°C-tan eta 200rpm-tan. Azkenik, transformazio nahastearen 50-100 $\mu$ L aurrez prestatutako LBA (anpliznadun LB mediaoa) mediodun Petri plakatan zabaldu ziren.

### 8.4. DNA plasmidikoaren erauzketa.

DNA plasmidikoa erauzteko, aztertu nahi zen bakterio koloniaren alikuota bat inokulatzen zen LBA likidoaren 10mL tan (50mL-ko hodi batean). Inokulua 37°C-tan, 16 orduz 220rpm-tan hazi zen. Erauzketa GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich) kitaz egin zen, bertan jasotzen den prozedura jarraituz. Plasmidoaren erauzketa egokia gauzatu zela ziurtatzeko, agarosatan %0.8 den gel batean erauzitako laginen elektroforesia burutu ohi zen.

### 8.5. Proteina errekonbinanteen adierazpena *E. coli*-n.

Proteina jakin bat *E. coli*-n adierazteko, berau kodetzen duen DNA sekuentzia klonatua duen pGEX-2T plasmido errekonbinantea daramaten *E. coli* zelulak erabiltzen ziren (ikus 1.3. puntua). Intereseko proteinaren adierazpena hazkuntza mediora IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranosidoa) konposatua gehituz induzitu daiteke.

Lehenik, intereseko bakterio kolonia bat 10mL LBA likidotan inokulatu zen eta 37°C-tan hazi zen 16 orduz eta 220rpm-tan. Hamasei ordura, kutibotik 1mL hartu eta 50mL LBA medio berritan diluitu zen 250mL-ko erlenmeyer batean. Bigarren kultiboa, berriz ere, 37°C-tan

## 2. KAPITULUA:

---

agitazioz (220rpm) inkubatzen zen bere OD<sub>600nm</sub> 0.5 izan arte. Bakterioaren hazkuntzak puntu optimo hori lortzean, kultiboari IPTG-a gehitu zitzaion 0.1mM-eko amaiera kontzetrazioaz eta 24 orduz inkubatu zen 15°C-tan eta agitazioaz. Hurrengo egunean, kultibo guztia zentrifugatu (10min, 4000rpm) eta *pellet*-a proteasa inhibitzaileak zituen (Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) 15mL PBS disoluzio (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH-a 7.3ra doitu eta iragazia) hotzetan erresuspenditu zen. Proteina erazteko, zelulak sonikazioz lisatu ziren (Labsonic® P., B. Braun Biotech). Zelula suspentsioa 15mL-ko 3 hodietan banatu eta 5mL-ko alikuota bakoitzari 30 segundoko 12 pulstu burutu zitzaizkion. Azkenik, lisatua 25 minutuz zentrifugatu (4°C, 14000rpm), gainjalkina 2mL-ko hodietan banatu eta laginak -80°C-tan jaso ziren.

Kontrol moduan hainbat lagin hartu zen prozedura guztian zehar. IPTG-ren indukzioz proteina ondo adierazi zela egiaztatzearen, IPTG-dun eta IPTG gabeko laginak hartu ziren konposatua gehitu aurretik eta ondoren. Bestalde, proteina nagusiki frakzio solbagarrian (ur frakzioa) aurkitzen zela baieztatzeko, frakzio solbagarria, frakzio prezipitatua eta estraktu totalaren laginak jaso ziren. Horiei poliakrilamida elektroforesia burutu eta BioSafe™ Coomassie (G-250 Stain, Bio-Rad) bitartez tindatu ziren proteina presentzia detektatzeko.

## 9. *Aspergillus nidulans* onddoaren proteina erazketa eta manipulazioa.

### 9.1. Proteina erazketa.

Erauzitako proteinen erabileraren baitan bi erazketa metodo bereizi ziren. Proteina jakin baten immunodetekzioa helburu izan zenean lisi alkalinoaz erazti ziren laginak. Aldiz, proteina lagin horiek jarraian *pull-down* entseguetan erabili behar baziren bigarren protokolo bat jarraitu zen.

- 9.1.1. Lisi alkalinoa (1 metodoa).

Metodo honekin erauziriko proteinak *Western-blot* bidez detektatuko ziren. Erauzketa prozedura hau (Hervás-Aguilar eta Peñalva, 2010) lanean azaltzen da eta MFA medio likidoan hazitako eta ondoren liofilizatutako mizeliotik abiatzen da. Mizelio liofilizatuaren 6-7mg homogenizatu (Mini-Beadbeater, Biospec) 1mL lisi disoluzioaz (0.2M NaOH eta %0.2 β-merkaptotanol (v/v)) disolbatu ziren. Jarraian, proteinak hauspearazteko azido trikloroazetikoa (TCA) %7.5 (p/v)-an gehitu eta gogor nahastu zen. Nahastea 10 minutuz izotzetan inkubatu zen eta jarraian 5 minutuz 14000rpm-tan (4°C) zentrifugatu zen. Gainjalkina huts-pekoaz xurgatu ostean, TCA arrastoak guztiz ezabatu zirela ziurtatzeko, TCA-rekin bigarren aldiz errepikatu zen hauspeatzea. Proteina laginak gordetzeko, *pellet*-ari 100μL Tris Base (1M) eta 200μL karga tanpoia (62.5Mm Tris-HCl pH=6.8, %2 SDS (p/v), %5 β-merkaptotanol (v/v), 6M urea eta %0.05 *bromophenol blue* (p/v)) gehitu zitzaizkion eta indarrez nahastu ziren *vortex*-z. Laginak 4°C-tan gorde zitezkeen aurrerago erabiltzeko, edo jarraian kargatu SDS-poliakrilamida gelean immunodetekzio azterketarako. Kargatu baino lehen, laginak 95°C-tan 5 minutuz berotu eta minutu batez 14000rpm-tan zentrifugatu ziren. Gainjalkina baliatuko zen SDS-poliakrilamida elektroforesia burutzeko.

- 9.1.2. Proteina erauzketa luzea (2 metodoa).

*Pull-down* entsegetarako proteina erauzkinak (Fernández-Martínez *et al.*, 2003) lanean deskribatzen den protokoloan oinarriturik erauzi ziren. MFA-tan hazitako eta ondoren filtratutako mizelio laginak N<sub>2</sub>-tan izoztu, liofilizatu eta homogeneizatu ziren. Laginen 200-250mg mizelio birrindu proteasa inhibitzaileak (Roche) zituen 1mL A50 erauzketa *buffer*-ean (25Mm HEPES (pH=7.5), 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, %10 glizerola, 0.5mM 1,4-ditiotreitol(DTT)) disolbatu ziren. Mizelio suspentsioak 90 minutuz 4°C-tan inkubatu ziren errore birakari batean. Jarraian 14000rpm-tan, 30 minutuz 4°C-tan zentrifugatu ziren eta

## 2. KAPITULUA:

---

gainjalkinak jaso ziren. Gainjalkinean aurkitzen zen proteina kontzentrazioa Bradford metodoaz (Bradford, 1976) determinatu zen.

Neurtutako kontzentrazioaren baitan 200µg proteina prezipitarazi ziren, gainerako proteina suspentsioa -80°C-tan gorde zen bitartean *pull-down* entseguetan erabiltzeko. Azken lagin hauek hauspearazteko, TCA-n %10 (p/v) den disoluzioa gehitu eta 10 minutuz izotzetan inkubatu ziren. Jarraian, laginak 14000rpm-tan, 5 minutuz 4°C-tan zentrifugatu ziren, gainjalkina baztertu eta *pellet*-ak etanol:eter etiliko nahasteaz (1:1 eta 1:3; hurrenez hurren) bitan garbitu ziren. Etanol:eter etiliko arrastoak lehortuta, proteina hauspeatua 80µL karga tanpoian disolbatu zen. Lehen metodoaz egin bezala (9.1.1. puntua), laginak gorde edo SDS-poliakrilamida gelean karga zitezkeen modu berean.

### 9.2. Proteina-proteina erretentzio entseguak (*Pull-Down*).

Proteina jakinen arteko ustezko interakzio bat aztertzeko, proteina-proteina erretentzio entseguak burutu ziren. Probak *in vitro* edo *in vivo* egin ziren, kasu batean edo bestean metodologia desberdinak jarraitu zirelarik. *In vitro pull-down* entseguetan *E. coli*-n adierazitako proteinak erabili ziren amu gisa; aldiz, *in vivo* probetan *A. nidulans*-en andui desberdinen proteina lagin endogenoak erabili ziren.

- 9.2.1. Proteina-proteina erretentzio esperimntua *in vitro*.

*Pull-down* esperimntu hauetan GST-z fusionatutako intereseko proteina adierazten zuten (8.5. puntua) *E. coli*-ren estraktuak erabili ziren. GST sekuentziari esker, intereseko proteina *glutathion sefarosa* erretxinera lot daiteke amu moduan jokatuz. Bestalde, *A. nidulans*-en proteina estraktu totalak (9.1.2. puntuan azaldua) erabili ziren, non aztergai zen bigarren proteinak epitopo bat zeraman bere immunodetekzioa ahalbidetuko zuena.

Protokoloari dagokionez, lehenik 60µL *glutathion sefarosa* (GE Healthcare) erretxin 1.5mL-ko hodi batean gehitu eta PBS tanpoiaren 200µL-rekin bi garbiketa burutu ziren, 2 minutuz, 5000rpm eta 4°C-tan zentrifugatu. PBS *buffer*-a aurrez prestatu zen (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH-a 7.3ra doitua eta iragazia), osagaiei proteasa inhibitzaileak (Roche) ere gehituz. Jarraian, erretxinari *E. coli*-ren estraktuaren 400µL gehitu zitzaizkion eta lagina ordubetez 4°C-tan inkubatu zen errotore birakari batean. Behin GST eta intereseko proteinaren arteko kimera erretxinera lotuta, 200µL PBS-z (proteasa inhibitzaileak eta %1 (v/v) Triton™ X-100 (Roche) zituen) hiru garbiketa egin ziren erretxinera lotu ez ziren proteina arrastoak ezabatzearen. Ondoren, *A. nidulans*-en proteina estraktu totalaren 2mg erretxinaz batera inkubatu ziren 40 minutuz 4°C-tan errotore birakarian. Inkubazioaren ostean, hodiak zentrifugatu (2 minutu, 5000rpm eta 4°C) eta gainjalkina jaso zen erretxinitu ez ziren proteinen frakzio gisa (NR). Bien bitartean, erretxinari lau garbiketa egin zitzaizkion proteasa inhibitzaileak eta %1 (v/v) Triton™ X-100 zituen PBS disoluzioaz. Azkenik, erretxinera lotutako GST-proteina kimera eta honi atxiki ziren gainerako proteinak 30µL karga tanpoian erresuspenditu ziren. Erretxinitutako frakzioa (R) aztertzeko, NR frakzioaz nahiz estraktu totalaren (ET) laginez batera, SDS-poliakrilamida elektroforesia burutu zen eta *western-blot* (9.3 sekzioa) bidez ustezko interaktorearen presentzia aztertu zen R frakzio horretan.

- 9.2.2. Proteina-proteina erretentzio esperimentua *in vivo*.

Proteina-proteina ustezko interakzioak *in vivo* aztertzeko RFP-Trap® edo GFP-Trap® (Chromotek) erretxina duten zutabeak erabili ziren. Kasu honetan, amu gisa erabiliko zen proteinak erretxinera lotuko zen epitopoa izan behar zuen (RFP edo GFP). Aldi berean, amu-proteinaren ustezko interaktorea bigarren epitopo batekin egon behar zuen etiketatua *western-blot*-an detektatzeko.

## 2. KAPITULUA:

---

Prozedurari dagokionez, Chromotek etxe komertzialak eskainitako protokoloa jarraitu zen, *A. nidulans* onddora moldatuta. Proteina erauzketarako, 9.1.2 puntuan azaldu diren urratsak jarraitu ziren, baina beste erauzketa *buffer* bat erabiliz (5mM HEPES (pH=7.5), 1mM EDTA, %0.1 NP-40, 150mM NaCl, 50mM NEM eta proteasa inhibitzaileak).

*Pull-down*-arekin hasteko, 25µL RFP-Trap®\_A (edo GFP-Trap®\_A) erretxin 500µL *dilution buffer*-tan (5mM HEPES (pH=7.5), 0.5mM EDTA, 20mM KCl, %0.1 NP-40, 150mM NaCl, 50mM NEM eta proteasa inhibitzaileak) erresuspenditu ziren. Jarraian zutabea zentrifugatu (2 minutu, 2500g eta 4°C) eta gainjalkina baztertu zen. Garbiketa urrats hau birritan errepikatu zen. Behin erretxina prest edukirik, 6mg proteina estraktu total gehitu zitzaizkion eta 90 minutuz 4°C-tan inkubatzen eduki ziren errotore birakarian. Erretxina eta proteina arteko elkarrekintzari bide eman ondoren, laginak zentrifugatu (2 minutu, 2500g eta 4°C) egin ziren bi frakzioak (R eta NR) bereizteko. Gainjalkina bildu eta %10 TCA gehituz, erretxinera erretenitu gabeko proteinak prezipitarazi ziren (NR), jarraian karga tanpoian jasotzeko (9.1.2-n azaldu bezala). Erretxinean erretenituta geratutako lagin proteikoa, berriz, zuzenean 100µL karga tanpoian birdisolbatu eta gorde zen.

Aurreko puntuan (9.2.1. puntuan) egin bezala, R, NR eta ET frakzioekin SDS-poliakrilamida elektroforesia burutu zen. *Western-blot*-an amu bezala erabilitako proteinaren ustezko interaktorea zein frakziotan (edo frakzioetan) aurkitzen zen behatu zen.

### 9.3. Proteinen immunodetekzioa.

Proteinen banaketarako laginen elektroforesia burutu zen SDS-poliakrilamida gel desnaturalizatzailez (SDS-PAGE; (Sambrook *et al.*, 1989)). Aurrez, laginak desnaturalizatu egin ziren (9.1.1. puntuan azaldu bezala) eta bakoitza poliakrilamidatan %10 ziren bi geletan (aurretik 9.1.1 puntuko erauzketa prozedura jarraitu bazen, gel bakarra) kargatu zen (Laemmli, 1970). Geletako bat Bio-Safe™ Coomassie-z tindatuko zen proteina laginen integritatea ziurtatzeko, eta

bigarrena epitopodun proteinen immunodetekziorako erabili zen. Immunodetekziorako baina, lehenik proteinen transferentzia burutu zen geletik PVDF (polibinilideno difluoruro; 0.2µm) mintzera (Trans-blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad). Ondoren, mintza esne hautsetan %5 zen PBS-tan blokeatu zen, proteinarik lotu ez zen mintzaren guneetan antigorputzen lotura inespezifikorik gerta ez zedin. Jarraian, epitopoekiko espezifikoak ziren antigorputz primarioekin inkubatu zen mintza, antigorputzen hibridaziorako (2.8. taula). Beharrezko garbiketak egin ostean, (HRP) peroxidasa entzimarekin konjugatutako antigorputz sekundarioekin errepikatu zen hibridazioa. Peroxidasak, ondoren gehituko zen ECL erraktiboarekin (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad) erreakzio luminiszentzia ahalbidetzen du, entzimaren eta beraz aztergai den proteinen detekzioari bide ematen diona. Luminiszentzia emaitzak ChemiDoc™ XRS+System (Bio-Rad) aparatuaz jaso ziren. Irudiak ImageLab (5.1 bertsioa; Bio-Rad) software askez aztertu ziren.

**2.8. Taula:** *Western-blot*-ean epitopo bakoitzaren detekziorako erabilitako antigorputz primario eta sekundarioak, bai eta erabili ziren diluzioak.

| Antigorputzak |             | Diluzioa | Iturria | Erreferentzia                           |
|---------------|-------------|----------|---------|---|
| Primarioak    | α-GFP       | 1:1000   | Sagua   | Roche                                   |
|               | α-HA        | 1:1000   | Sagua   | Santa Cruz                              |
|               | α-RFP       | 1:4000   | Untxia  | USBiological                            |
| Sekundarioak  | α-sagu IgG  | 1:2500   | Ahuntza | Jackson ImmunoResearch Laboratories INC |
|               | α-untxi IgG | 1:10000  | Astoa   | Sigma-Aldrich                           |

## 10. Fluoreszentzia mikroskopia.

*A. nidulans*-en proteinen lokalizazio subzelularra fluoreszentzia mikroskopia bidez aztertu zen. Aurrez baina, aztertu nahi ziren proteinak hainbat fluoreszentzia epitoporekin etiketatu ziren (ikus 6.1. *A. nidulans*-en gene delezio eta etiketatzea atala).

## 2. KAPITULUA:

---

Erabilitako mikroskopioak:

- Leica DMI-6000b mikroskopio alderantzikatua, oliotan murgiltzen den Leica lentea (63x, Plan Apo 1.4 N.A.) daramana. Filtroei dagokienez, GFP filtro berdea (470 nm-tan kitzikatu eta 525nm-tan emititzen da) eta Txred gorria (562 nm-tan kitzikatu eta 624nm-tan emititzen da) erabili ziren.
- Zeiss Axio Observer Z1 mikroskopio alderantzikatua, oliotan murgiltzen den lentea (63x, Plan Aplanachromat 1.4 N.A.) duena, nahiz 38 filtroa (470 nm-tan kitzikatu eta 525nm-tan emititzen da) eta 43 filtroa (545 nm-tan kitzikatu eta 605nm-tan emititzen da).

Azterketarako, banakako (81151 katalogo zenbakia) edo 8 gelaxkatak (80821) ibidi plakak erabili ziren; horietan 3mL edo 300µL WMM (2.3.taula) medio gehitzen ziren, hurrenez hurren, beharrezko elikagai osagarriekin batera. Aztergai zen anduiaren esporak Tween®20-tan %0.02 v/v zen disoluzio baten 40 µL-tan erresuspenditu eta plakak inokulatu ziren. Laginak 16 ordu inguruz 25°C-tan hazten ziren, agitaziorik gabe. *nudA1* eta *kapA31* mutazio termo sentikorren kasuan, onddoa 28°C-tan hazi ondoren (tenperatura permisiboan) eskuratu ziren mikroskopia irudiak, lehenik. Eta jarraian, tenperatura murriztailean aldaketarik antzematen zen aztertzearen, laginak 37°C-tan inkubatu ziren 3-5 orduz. Bestalde, PmtC::GFP-ren erretikulu endoplasmatikoko ustezko lokalizazioa aztertzeko, WMM medioari 0.8mM DTT (ditiotreitola) gehitu zen (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2013). DTT-aren adizioak PmtC::GFP deslokalizatzen zuenentz aztertu zen.

Fluoreszentzia irudiak aztertu eta neurketak egiteko ImageJ software irekia (<https://imagej.nih.gov/ij/>; US. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) erabili zen. Fluoreszentzia neurketen kasuan, programaren bitartez hifen punta eta nukleoaren arteko intentsitate erlazioak erdietsi ahal izan ziren. Intentsitate balioak estatistikoki tratatu ziren, t proba-ren bitartez, anduiaren artean desberdintasun adierazgarri baten zehazteko.



## 11. Baliabide eta azterketa bioinformatikoak.

Aztertutako sekuentziak *Aspergillus Genome Database* ([www.aspgd.org](http://www.aspgd.org)) datu basetatik eskuratu ziren. Eraikitako konstrukzio genomikoak *Vector NTI* (Invitrogen) programaz diseinatu ziren. Erreferentziazko eta sekuentziazera bidalitako fragmentuen sekuentziak *Lalign* algoritmoaz alderatu ziren ([www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)). DNA (Stabvida, Caparica, Portugal; 90x-eko batezbesteko *coverage*-a) eta RNA-seq (Garzia *et al.*, 2013; Oartzabal-Arano *et al.*, 2015) irakurketak aztertzeko eta alderatzeko *Integrative Genomics Viewer* (IGV; Broad Institute; (Robinson *et al.*, 2011)) programa erabili zen. Bestalde, azido nukleiko nahiz proteina sekuentzien BLAST-k (*Basic Local Alignment Search Tool*) burutu ziren NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eta EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) web atarietan, ortologoen bilaketa edo sekuentzien identifikaziorako.

Proteina sekuentzien azterketarako, BLAST-z gain, ondorengo tresna bioinformatikoak erabili ziren. Sekuentziak alineatzeko Clustal omega erabili zen (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) eta alineamendu emaitzak Genedoc *software*-az aztertu ziren. Proteina sekuentzietan aurki zitezkeen eremu funtzionalak aurreikusteko InterPro (Mitchell *et al.*, 2019) predikzio plataforma baliatu zen. Bestalde, proteinen egitura hiru dimentsionalaren ereduak irudikatu ziren Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) eta SwissModel (Waterhouse *et al.*, 2018) plataformen bidez. SwissModel-k proposatutako eredian oinarrituz, DynaMut plataformaz (Rodrigues *et al.*, 2018), mutazio espezifiko batek proteinaren konformazioan zer-nolako eragina izan zezakeen aztertu zen. Bai eta, SwissModel-n ereduez bi proteinen arteko konformazio predikzioa burutu zen HawkDock zerbitzariak (Weng *et al.*, 2019). Azkenik, zuhaitz filogenetikoak eraikitzeko MegaX (7.0 bertsioa) (Kumar *et al.*, 2018) *software*-a erabili zen, eta iTOL (Interactive Tree of Life, 5.2 bertsioa) (Letunic eta Bork, 2019) horiek editatzeko.



**3.KAPITULUA:  
FlbB-ren sintesi mekanismoa eta garraio  
akropetala**



## 1. Sarrera.

FlbB-k *Aspergillus nidulans* onddoaren garapen asexuala nola kontrolatzen duen ezagutze aldera hainbat azterketa egin dira egundaino. Alabaina, ez da ezagutzen FlbB-ren sintesiaren erregulazioa nola gauzatzen den. Ohiko hazkuntza baldintzetan FlbB-ren presentzia ezinbestekoa bada onddoak konidiatuko badu, proteinaren neurritz kanpoko adierazpenak (*alcA* promotoreaz) garapen asexualaren patroia aldatu dezake (Etxebeste *et al.*, 2009a). Beraz, badirudi FlbB kontzentrazio egokian aurkitzea ezinbestekoa dela garapen asexuala zuzen burutzeko eta, ondorioz, *flbB*-ren adierazpena kontrolatzea beharrezkoa dela. *flbB*-ren adierazpen patroia behatuz gero, hazte begetatiboan zehar mRNA maila baxuan eta egonkorrean aurkitzen da, garapen asexualaren lehen orduetan nabarmenki igo egiten da, maximo bat emanez indukzioetik 4-6 ordura, eta ia detektaezina da garapen sexualean (Etxebeste *et al.*, 2008).

Kapitulu honetan, *flbB*-ren adierazpena eta itzulpena uORF eremuek erregula ote zezaketen aztergai izan da. uORF-ak (*upstream open reading frame*) sekuentzia laburrak dira, ORF nagusiaren aurretik (5'-rantz) aurkitzen den hasiera kodoi bat dute eta "stop" kodoi bat ORF nagusiarekiko irakurketa fase berean. Eremu hauen presentzia sarritan proteina maila baxuekin lotuta egon ohi da, itzulpen gaitasuna mugatu (erribosoma blokeatu) edo RNA mezulariaren egonkortasuna kalte baitezakete (Barbosa *et al.*, 2013). Aurre azterketek *flbB*-ren promotorean bi uORF eremu egon zitezkeela iradokitzen zuten. Hipotesi honi helduta, uORF eremuek FlbB proteinaren sintesia kontrola zezaketen aztertu zen.

FlbB TF moduan bereizgarritzen duen ezaugarri bat bere lokalizazio apikala da. Izan ere, TF-a izaki, nukleoetan aurki daiteke, baina lokalizazio nuklearraz gain hifen puntetan ere aurkitzen da (Etxebeste *et al.*, 2008). Puntan duen kokagune hau estrategikotzat jo ohi da, kanpo inguruko estimuluren bat nolabait jaso eta nukleora bueltan seinaleen transdukzio lanetan baitihardu, estimulu horien aurrean garapen asexuala aktibatu behar den ala ez erabakitze

### 3. KAPITULUA:

---

(Oartzabal-Arano *et al.*, 2016). Lokalizazio bereizgarri hori dela eta, kapitulu honetan FlbB-ren puntaranzko garraioa, edo garraio akropetala, aztertzen jarraitu da.

FlbB puntan kokatuko bada ezinbestekoa du FlbE proteinaren bitartekaritza. FlbE bera ere UDA bideko partaide da, eta *flb* adierari jarraiki (*fluffy with low brlA expression*) bere gabeziak fenotipo akonidiala eragiten du (Garzia *et al.*, 2009). Bi proteinek konplexu bat osatu eta elkarrekin puntaranzko bidea egiten dutela proposatu izan da, jarraian puntan elkarrekin kokatzen direlarik. Elkar kidetza estua dute, bietako baten galerak bestearen lokalizazio apikalaren galera ekartzearaino. Hain zuzen,  $\Delta flbE$  fondo genetikoan FlbB-k lokalizazio apikala galdu egiten du eta proteina beraren egonkortasuna ere kaltetzen dela ikusi da (Garzia *et al.*, 2009). *gpdA* promotoreaz, *gpdA<sup>p</sup>*, FlbB-ren adierazpena areagotu denean ere, ezin izan da puntan detektatu aipatutako  $\Delta flbE$  fondo genetikoan (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Ondorioz, FlbB nukleoetan kokatu arren, onddoa ez da *brlA*-ren adierazpena eragiteko gai, eta fenotipo akonidiala izaten jarraitzen du fondo genetiko nulu honetan. Beraz, badirudi FlbB TF gisa aktiboa izan dadin, alegia *brlA*-ren transkripzioa indultzeko, puntatik pasa behar duela, eta horretarako FlbE-ren beharra du. Alderantzizko efektua ere hauteman da. Bai FlbB eta bai FlbE *gpdA<sup>p</sup>*-z konstitutiboki adieraztean, FlbB-ren presentzia apikala indartzen da eta medio likidoan konidioforo goiztiarren agerpena deskribatu izan da (Otamendi *et al.*, 2019b). Beraz, hifen puntan FlbB-ren kantitatea FlbE-ren baitakoa da. Baina aldi berean, FlbE berak ere FlbB-ren beharra du puntara ailegatzeko; eta FlbE-ren gain-adierazpena, *alcA<sup>p</sup>*-az, ez da gai *flbB* nuluaren fenotipo akonidiala gaintzeko (Garzia *et al.*, 2009). Bi proteinak, garapen asexuala indultzeko seinalizazio bidean, maila berean aurkitzen dira, beraz, eta elkarrekiko menpekotasuna dute.

Bi proteinen arteko harremana sarritan ikertu da, eta hainbat lanetan deskribatu izan dira FlbB nahiz FlbE-ren eremu funtzionalek nola eragiten duten kidetza horretan (Garzia *et al.*, 2009; Herrero-Garcia *et al.*, 2015; Otamendi *et al.*, 2019). Ko-lokalizazio apikalaren eta garraio bateratuaren atzean bi proteinen arteko interakzio posiblea detektatu izan da *in vitro* (FlbB *E. coli* bakterioan adieraziz) egindako *pull-down* entseguen (Herrero-Garcia *et al.*, 2015; Otamendi

*et al.*, 2019). Horrela, kapitulu honen bigarren helburua, FlbB/E-ren puntarazko garraio akropetala eta lokalizazio apikala nola gauzatzen den argitzen jarraitzea izan da. Bide horretan, aurretiko ikerketa-ildoei heldu zaie.

## 2. Emaitzak.

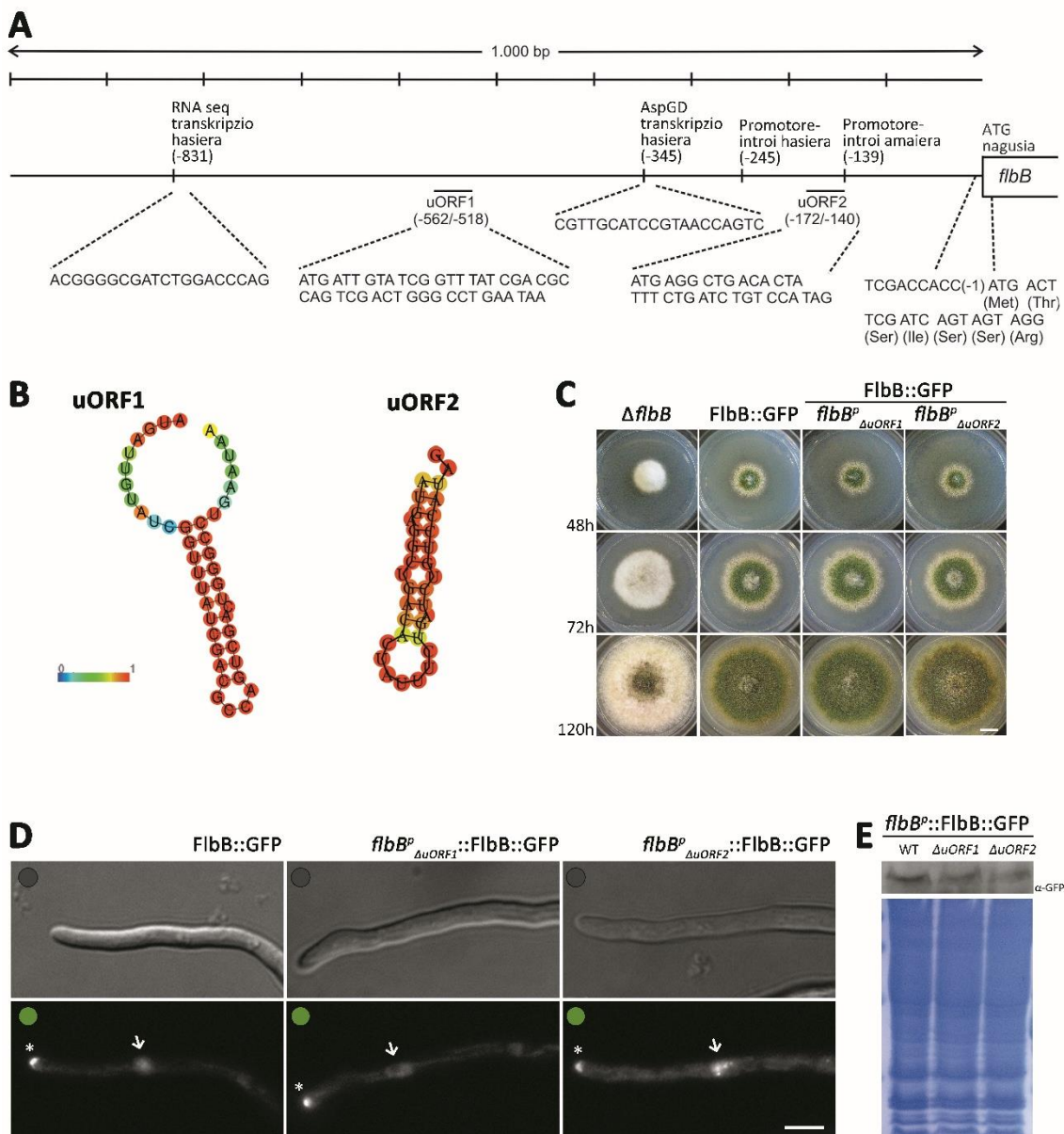
### 2.1. *flbB*-ren promotoreko uORF-en azterketa.

ORF nagusiaren hasieratik 5'-rantz aurkitzen diren uORF sekuentzia laburrek sarritan transkripzio ondorengo erregulatzailerik gisa jokatzen dezakete. *flbB*-ren promotorearen kasuan, uORF sekuentzien definizioa beteko luketen bi eremu aurkitzen dira. uORF bilatzaile bioinformatikoez (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) *flbB*-ren 5'-UTR eremu barruan bi hasiera kodoi (ATG) topatu zituzten, 3.1A irudian zehazten diren posizioez. Stop kodoi banaz, uORF eremu erregulatzailerik hauek 10 eta 14 kodoi izango lituzkete, hurrenez hurren. Sekuentzia horiek nola jardun lezaketen aurreratzeko, RNA-tolestura iragarpen algoritmoaz (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; Gruber *et al.*, 2008) osatuz egitura sekundarioen aurreikuspenak behatu ziren. Lehen uORF-aren kasuan, uORF1, *hairpin* egitura sekundarioa har dezakeela iragarri zen (3.1B ezkerreko irudia; gutxienezko energia askea -12.60 kcal/mol izan zen uORF1-entzat, uORF2-ren -3.60 kcal/mol balioaz alderatuz). Egitura honek erribosoma, ATG nagusiaren bilaketan, 3'-rantz mugitzea oztopa lezake, honela ORF nagusiaren itzulpen efizientzia jaitsarazi eta erregulatuz. Bigarren uORF-ari zegokionez, uORF2, *flbB*-ren promotorean introi batean egongo litzateke RNAseq datuen arabera (Garzia *et al.*, 2013; Oizartzabal-Arano *et al.*, 2015), 3.1A irudian ikus daitezkeen moduan. Beraz, uORF honek ez luke mRNA-ren egonkortasuna edo itzulpena kontrolatuko, beti ere garapen asexualeko beste etaparen batean introi hori ezabatzeari utziko ez balitzaio.

Ustezko bi uORF hauen kontrol rola aztertzeko, eremu horietako bakoitza ezabatu zen *A. nidulans*-en genomatik, eta FlbB::GFP kimera basatia promotore natibo mutatupean

### 3. KAPITULUA:

adierazten zuten anduiak sortu ziren: *flbB<sup>p</sup> $\Delta$ uORF1::FlbB::GFP* eta *flbB<sup>p</sup> $\Delta$ uORF2::FlbB::GFP*. uORF horiek FlbB-ren sintesia mugatuko balute, eremu horien gabeziaz FlbB-ren adierazpen maila altuagoa espero genezakeen. Modu berean, ustezko FlbB proteinaren gehikuntzak espora ekoizpena areagotu ote zezakeen galdetu zen. Hasiera batean, fenotipoari dagokionez,  $\Delta$ uORF1 eta  $\Delta$ uORF2 anduietan ez zen aldaketarik antzeman andui basatiarekiko. 3.1C irudian medio solidoan 37°C-tan hazten jarri eta denbora desberdinetara aurkeztutako fenotipoak erakusten dira. Hain zuzen, espora kontaketak ere ez zuen aldaketa adierazgarririk mahairatu (ez erakutsia).





**3.1. irudia: *flbB*-ren 5'-UTR eremuan aurkitzen diren uORF-n azterketa.** A) *flbB*-ren 5'-UTR eremuaren irudikapena. AspGD datu basearen eta eskura diren RNAseq irakurketen (Garzia *et al.*, 2013; Oartzabal-Arano *et al.*, 2015) arabera transkriptoaren hasiera posizioak zehazten dira eskema honetan. Bertan, ORF nagusiaren ATG hasiera kodoiaz gainera, uORF1 eta uORF2 eremuak nahiz promotorean kokatzen den introiareneko posizioak adierazten dira ere. B) uORF1 eta uORF2-ri dagokien RNA-egitura sekundarioen predikzioak, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RFold.cgi> (Gruber *et al.*, 2008) algoritmoaren arabera. Egitura sekundarioaren irudikapenean, kolorez adierazten da baseek interakzionatzeko duten probabilitatea. C)  $\Delta flbB$  eta *flbB<sup>P</sup>::FlbB::GFP* erreferentzia anduiez batera, *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF1::FlbB::GFP* eta *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF2::FlbB::GFP* mutanteen fenotipoak erakusten dira medio solidoan, 37 °C-tan, hazten jarri eta 48, 72 nahiz 120 ordura. Eskala barra = 1cm. D) *flbB<sup>P</sup>::FlbB::GFP*, *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF1::FlbB::GFP* eta *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF2::FlbB::GFP* anduien hifen fluoreszentsia mikroskopia irudiak. FlbB::GFP-k ohiko lokalizazio apikal eta nuklearra izaten jarraitzen zuen promotore mutatuaren pean adieraztean. Fluoreszentsia seinaleaz ere ez zen intentsitate aldaketarik bereiztu (ikus testu nagusia). Eskala barra = 5 $\mu$ m. E) *flbB<sup>P</sup>::FlbB::GFP*, *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF1::FlbB::GFP* eta *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF2::FlbB::GFP* anduei dagokien proteina erauzkinean *Western-blot*-a. Ez zen FlbB-ren seinalearen areagotzerik ikusi erreferentziazko anduiaren laginaz alderatuta. *Coomassie* tindagaiaz tindatutako gel-a erakusten da karga kontrol moduan.

Fenotipoaz haratago, hifatan FlbB-ren presentzia altuagoa ote zen aztertu zen fluoreszentsia mikroskopiaz. Ez zen FlbB-ren lokalizazio subzelularrean aldaketarik antzeman, eta ez zirudien FlbB::GFP (promotore natibopean) erreferentzia anduiarekiko fluoreszentsia apikal nahiz nuklearraren intentsitatea igo zenik (3.1D irudia). Punta eta gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentsia erlazioak ere ohiko balioez jarraitu zuten. Berezko *flbB<sup>P</sup>*-z fluoreszentsia erlazioa  $1.81 \pm 0.45$  izan zen; aldiz, *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF1* anduiaren  $1.69 \pm 0.47$  eta *flbB<sup>P</sup> $\Delta$ uORF2* anduiaren  $1.66 \pm 0.43$  izan ziren erlazioak ( $p = 0.64$  eta  $p = 0.53$ , hurrenez hurren;  $p > 0.05$  izaki, aldaketa ez da adierazgarritzat jotzen;  $n = 6, 8$  eta  $10$  hifa andui bakoitzeko, hurrenez hurren).

Edonola, proteina mailan, uORF horien ezabaketak FlbB-ren kantitatean eragin ote zuen aztertzeko *Western-blot*-a burutu zen. Immunodetekzioz ez zirudien FlbB-ren seinalea areagotu zenik, ez  $\Delta$ uORF1 anduiaren proteina erauzkinean ez eta  $\Delta$ uORF2-renean ere (3.1E irudia). Beraz, emaitza guztiek iradokitzen dute uORF horiek ez dutela FlbB-ren proteina maila erregulatzen. Hasiere batean, hipotesia mahairatzean, RNA-maila aztertzeko *Northern-blot*-a egitea proposatu bazen ere, proteina mailan aldaketarik detektatu ez zenez ez zen teknika honekin jarraitu.

### 3. KAPITULUA:

---

#### 2.2. FlbB-ren puntarako garraioa FlbE-ren bitartekaritaz.

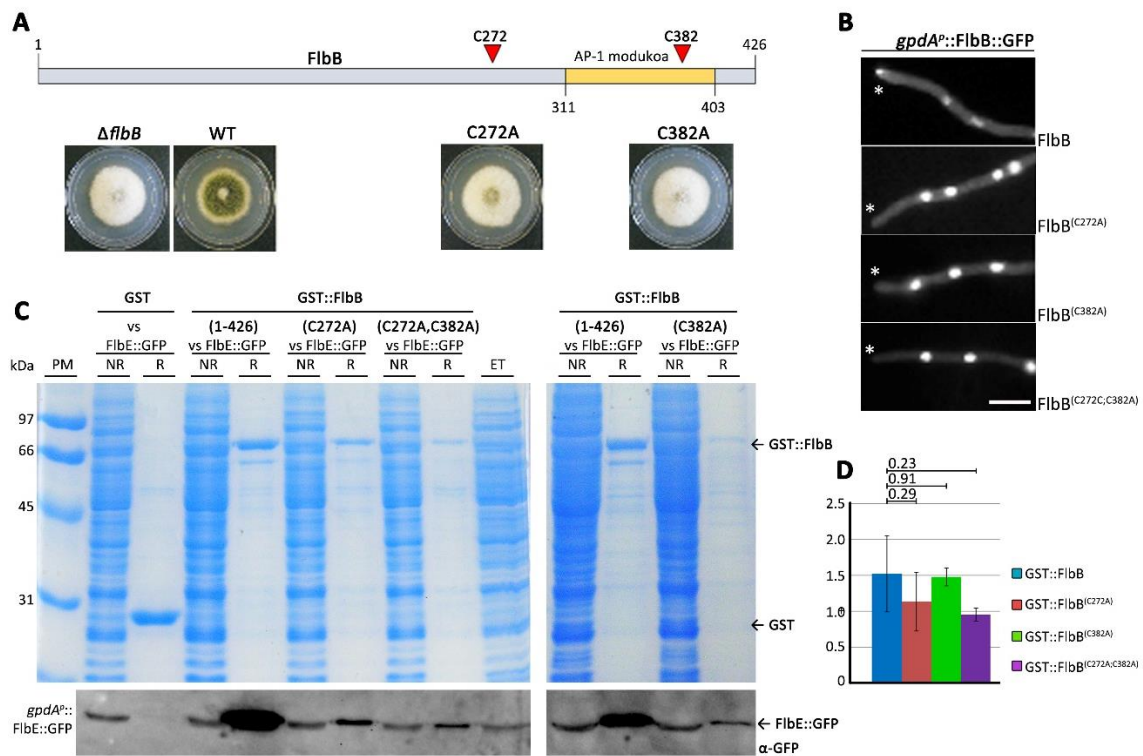
FlbE-k FlbB-ren garraio akropetalean eta lokalizazio apikalean duen parte-hartzea kontuan izanik, bi proteinek osatutako konplexuaren harreman eta koordinazio mekanismoa aztertzen jarraitu nahi izan zen. Horretarako, Elixabet Perez de Nanclares doktoreak irekitako hainbat ikerketa lerrori jarraipena eman zitzaion.

#### 2.2.1. FlbB-ren C727A eta C382A mutazioek FlbE-rekiko interakzioa ahultzen dute baina ez dute guztiz inhibitzen.

FlbB-ren 311 eta 403. aminoazido arteko eremuak AP-1 motako TF-en C-terminalaz antzekotasun handia du (Cortese *et al.*, 2011). Badirudi eremu honetako zisteinek eginkizun garrantzitsua dutela AP-1 faktoreen egitura, lokalizazio eta funtzioan (Delaunay *et al.*, 2000). FlbB-ren kasuan, 311-403 arteko eremu horretan aurkitzen ziren bi zisteinetatik, C382 eta C397, C382A aldaketak konidiazioa inhibitu eta FlbB hifen puntatik deslokaliza arazten ditu (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Modu berean, Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoreak FlbB-n aurkitzen ziren gainerako zisteina aminoazido guztiak banaka ordezkatu zituen alanina aminoazidoaz (Otamendi *et al.*, 2019). Andui mutante guztien artean, C272A aldaketa zeramanak soilik erakutsi zuen aurrez C382A mutanteak erakutsitako fenotipo berdina. Alegia, *gpdA<sup>p</sup>::FlbB<sup>(C272A)</sup>::GFP* kimera adierazten zuen anduiak *fluffy* fenotipoa aurkezten zuen, ziurrenik FlbB nahiz FlbE-k lokalizazio apikala galtzearen ondorioz (ikus 3.2A eta B irudietan FlbB-ren C272A eta C382A mutazioen posizioak, forma mutante horiek adierazten dituzten anduien fenotipoak eta FlbB<sup>Cys-to-Ala</sup>::GFP kimeren lokalizazioa hifatan) (Otamendi *et al.*, 2019).

(Herrero-Garcia *et al.*, 2015) lanean, C382A mutazioak bi proteinen arteko interakzioan zuen eragina ikertzeko, FlbB<sup>(C382A)</sup> vs FlbE *pull-down*-ak burutu ziren (*in vitro*; GST:FlbB kimera *E. coli* bakterioan kantitate handitan adieraziz, berau amu gisa erabiliz, eta *A. nidulans*-en adierazitako FlbE::GFP kimera heltzeko gai zen aztertuz). Bada, erreferentziako FlbB

basatiarekin alderatuz, mutazioaz interakzioa ahuldu (baina ez inhibitu) egin zela erdietsi zuten egileek. Modu berean, Elixabet Perez de Nanclares doktoreak identifikatutako C272A ordezkapena ere FlbE-rekiko elkarrekintza ahultzeko gai ote zen ikertzeko erretentzio entseguak errepikatu ziren. Kasurako, *E. coli*-n adierazitako GST::FlbB<sup>(C272A)</sup> (Perez de Nanclares doktoreak sortua) eta mutazio bikoitzeko GST::FlbB<sup>(C272A;C382A)</sup> (doktorego tesi honetan aztertua) proteina laginak erabili ziren amu gisa. Hauek, dagokion anduiaren proteina erauzkin totaletik FlbE::GFP kimerak hartzeko gai ote ziren aztertu zen (ikus Materialak eta Metodoak kapitulu 9.2.1 puntua).



**3.2. irudia: FlbB-ren C272A nahiz C272A;C382A mutazioek FlbE-rekiko interakzioan duten eragina. A)** (Otamendi *et al.*, 2019) lanetik hartu eta moldatutako irudiak. FlbB-ren proteina sekuentzia erakusten da, fenotipo akonidiala eragiten zuten C272A eta C382A zisteina mutazioen kokapenak bertan adierazten direlarik. Zisteinen posizioaz gain, FlbB-ren C-terminalean AP-1 motako TF-etan kontserbatzen den eremua erakusten da (Cortese *et al.*, 2011). Azpian,  $\Delta flbB$  eta WT erreferentzia anduiekin batera, *gpdA<sup>P</sup>::FlbB<sup>(C272A)</sup>::GFP* eta *gpdA<sup>P</sup>::FlbB<sup>(C382A)</sup>::GFP* anduien fenotipoak erakusten dira, 5.5 cm-ko diametroan plaketa, medio solidoan 37°C-tan 72 orduz inkubatu eta gero. Zisteinen mutazioek konidazioa inhibitzen zuten. B) (Otamendi *et al.*, 2019) lanetik hartu eta moldatutako fluoreszentzia mikroskopia irudiak. FlbB-ren lokalizazio subzelularra, *gpdA<sup>P</sup>*-z konstitutiboki FlbB::GFP; FlbB<sup>(C382A)</sup>::GFP; FlbB<sup>(C272A)</sup>::GFP edo FlbB<sup>(C272A;C382A)</sup>::GFP kimerak adierazten zituzten anduiekin. Zisteina horien aldaketek FlbB-ren lokalizazio apikala inhibitu zuten. Eskala barra = 5  $\mu$ m. C) *In vitro Pull-down* entseguak. Ezkerraldean, GST, GST::FlbB (1-426), GST::FlbB<sup>(C272A)</sup> eta GST::FlbB<sup>(C272A;C382A)</sup> fusioak amu gisa erabiliz

### 3. KAPITULUA:

---

(*Coomassie*-z tindatutako geletan geziez adierazten dira), FlbE::GFP kimera adierazten zuen anduiaren erauzkin proteikoaz egin ziren entseguak erakusten dira. Eskuinaldean, jada (Herrero-García et al., 2015) lanean aztertu zen FlbB<sup>(C382A)</sup> vs FlbE entseguak errepikatu ziren. ET: proteina erauzkin totala; NR (*non-retained fraction*): erretenitu gabeko frakzioa eta R (*retained fraction*): erretenitutako frakzioa. D) *Western-blot* eta *Coomassie*-z tindatutako gelen R erretentzio banden intentsitateen erlazioak erakusten dituen grafikoak. Emandako baloreak gutxienez hiru errepikapenen batezbestekoak dira, gehi desbideraketa estandarra. Goikaldean,  $p$ -ren baloreak erakusten dira. Kasu guztietan  $p \geq 0.05$  zenez, aldaketa ez adierazgarritzat hartu ziren.

GST::FlbB<sup>(C382A)</sup>-z gertatu bezala, erretxinean aberastutako GST::FlbB<sup>(C272A)</sup> (baita GST::FlbB<sup>(C272A;C382A)</sup> ere) frakzioak oso eskasak ziren, *Coomassie* irudiko erretentzio bandetan (R frakzioa) ikus daitekeen moduan (3.2C irudia). Alabaina, GFP-ren immunodetekzioz, erretentzio frakzioetan ere FlbE-ren banda detektatu ahal izan zen (3.2C irudia). *Coomassie*-az tindatutako gelaren R frakziotako banden eta *Western-blot* banden intentsitateen arteko erlazioa kuantifikatu zen (3.2D irudia), beti ere GST::FlbB forma basatiarekiko konparatuz. Kasu guztietan  $p > 0.05$  baloreak lortu ziren ( $n \geq 3$  kasu guztietan). Beraz, emaitzek iradokitzen zuten FlbB-ren C272A eta C382A ordezkapenek FlbE-rekiko elkarrekintza ahuldu zezaketela baina ez galarazi. Bi mutazioek batera ez zuten efektu gehigarri interakzioarengan eta maila berean dihardutela esan liteke.

#### 2.2.2. FlbE-ren E1 eremuko W11A mutazioak FlbE eta FlbB arteko interakzioa ahultzen du *in vivo pull-down* entseguetan.

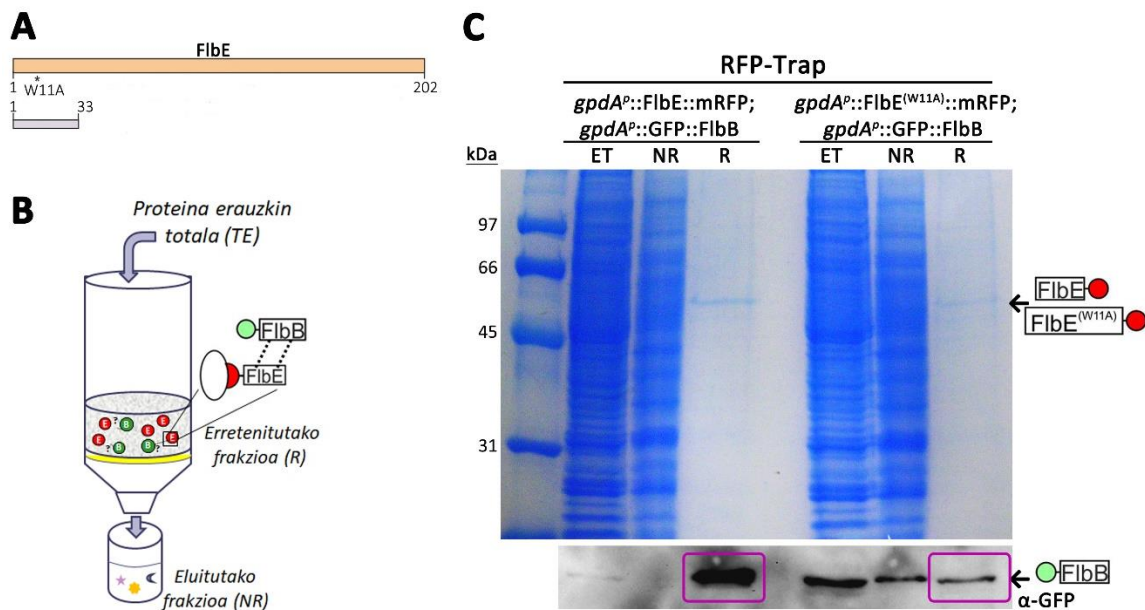
Elixabet Perez de Nanclares doktoreak FlbE-ren eremu funtzionalak aztertzeke hainbat mutante sortu zituen zuzenduriko mutagenesi prozeduraz (Otamendi et al., 2019). Horien artean, 1-33 aminoazidoen artean (E1 eremua) kokatzen den W11A aminoazido aldaketa burutu zuen (3.3A irudia). AspGD datu basearen arabera, eremu hori seinale peptido bat izan liteke. Hain zuzen, W11A mutazioak FlbE-ren, eta berarekin batera FlbB-ren, punta lokalizazioa galarazi zituen (Otamendi et al., 2019). Eta ondorioz, anduiaren konidiazio eza ere eragin zuen. Baliteke,

beraz, seinale peptidoa eraldatzean, honen funtzioa galarazi eta garraio akropetala inhibitua izana.

*Pull down*-ak burutzeko GST::FlbE proteina fusionatua ezin zitekeen erabili, FlbE-ren N-terminala etiketatzeak proteinaren funtzio galera baitakar; hain zuzen, E1 eremuaren garrantzia azal lezake efektu horrek ere (Otamendi *et al.*, 2019b). Ondorioz, Perez de Nanclares doktoreak *E. coli*-n adierazitako GST::FlbB eta FlbE<sup>(W11A)</sup>::HA<sub>3x</sub> kimerak adierazten zuen *A. nidulans*-en andui baten erauzkin proteikoaz burutu zituen *pull down* entseguak. Eta bi proteinen arteko erretentzio gaitasuna galdu zela deskribatu zuen (Otamendi *et al.*, 2019). Kapitulu honetan, RFP-Trap<sup>®</sup> erretxina komertzialaz (Chromotek), mRFP etiketadun kimerak erretentitzeko gai dena, eta *A. nidulans* onddoaren proteina endogenoaz *pull-down* entseguak *in vivo* burutu nahi izan ziren. Horretarako, gure laborategian lehen aldiz, zutabe komertzial horien erabilera protokoloa martxan jarri zen (ikus Material eta Metodoak kapituluan, 9.2.2. puntua). Kasurako, FlbE<sup>(W11A)</sup>::mRFP eta GFP::FlbB kimerak aldi berean eta biak *gpdA<sup>P</sup>* promotorepean adierazten zituen anduiaren proteina erauzkin totala erabili zen. Eta kontrol gisa berriz, FlbE aldaera basatia zeraman *gpdA<sup>P</sup>*::FlbE::mRFP; *gpdA<sup>P</sup>*::GFP::FlbB andui isogenikoaren proteina erauzkina. RFP-Trap<sup>®</sup> zutabeaz FlbE (forma basatia nahiz W11A mutantea) amu gisa erretxinera helduko zen, eta gure helburua GFP-ren immunodetekzioz FlbB erretentitu ote zen ikustea izen zen (3.3B irudia). Hain zuzen, 3.3C irudiko *Western-blot*-ean ikus daitekeen moduan, bi entseguen frakzio erretentituan FlbB-ren seinalea detektatu zen. Berezko tamainako FlbB bandaz gainera (75kDa inguruan), honen behelaldean FlbB-ren degradazio bandak ikusten ziren (FlbB *gpdA<sup>P</sup>*-z adierazten denean ikusi ohi direnak; ez erakutsia). Alabaina, FlbE<sup>(W11A)</sup> amuaz FlbB-ren banda ahulagoa zen aldaera basatiaz baino. Kontuan izan behar da *in vitro* probetan erretentzio banda guztiz desagertu zela (Otamendi *et al.*, 2019); aldiz, *in vivo* oraindik interakzioa detektatu zen. Bestalde, *Coomassie* tindagaiak tindatutako gelean, banda ahul bat antzeman zitekeen FlbE-ren tamaina parean; beraz, bazirudien zutabea egoki aberastu zela FlbE::mRFP (forma basatia nahiz W11A aldatua) kimeraz (3.3C irudia). Eta FlbE-rekin batera beste banda batzuk ere bereizi ziren

### 3. KAPITULUA:

tamaina desberdinetan, hauek FlbE-rekin interakzioa eduki lezaketen bestelako proteinak izan zitezkeelarik. Hain zuzen, horien artean FlbB eta FlbE-ren garraioan diharduten proteinak egon litezke. Erreferentziaren eta FlbE aldaera mutantearen banda patrioiak alderatzen saiatu ginen. Izan ere, seinale peptidoa mutatuta aurkituko balitz eta ondorioz garraio mekanismora lotzeko gaitasuna kaltetu, garraio mekanismoan bitartekari diharduten proteinak NR frakzioan erortzea esperoko litzateke FlbE<sup>(W11A)</sup>-z egindako *pull-down* honetan (3.3C irudia; ikus eztabaida).



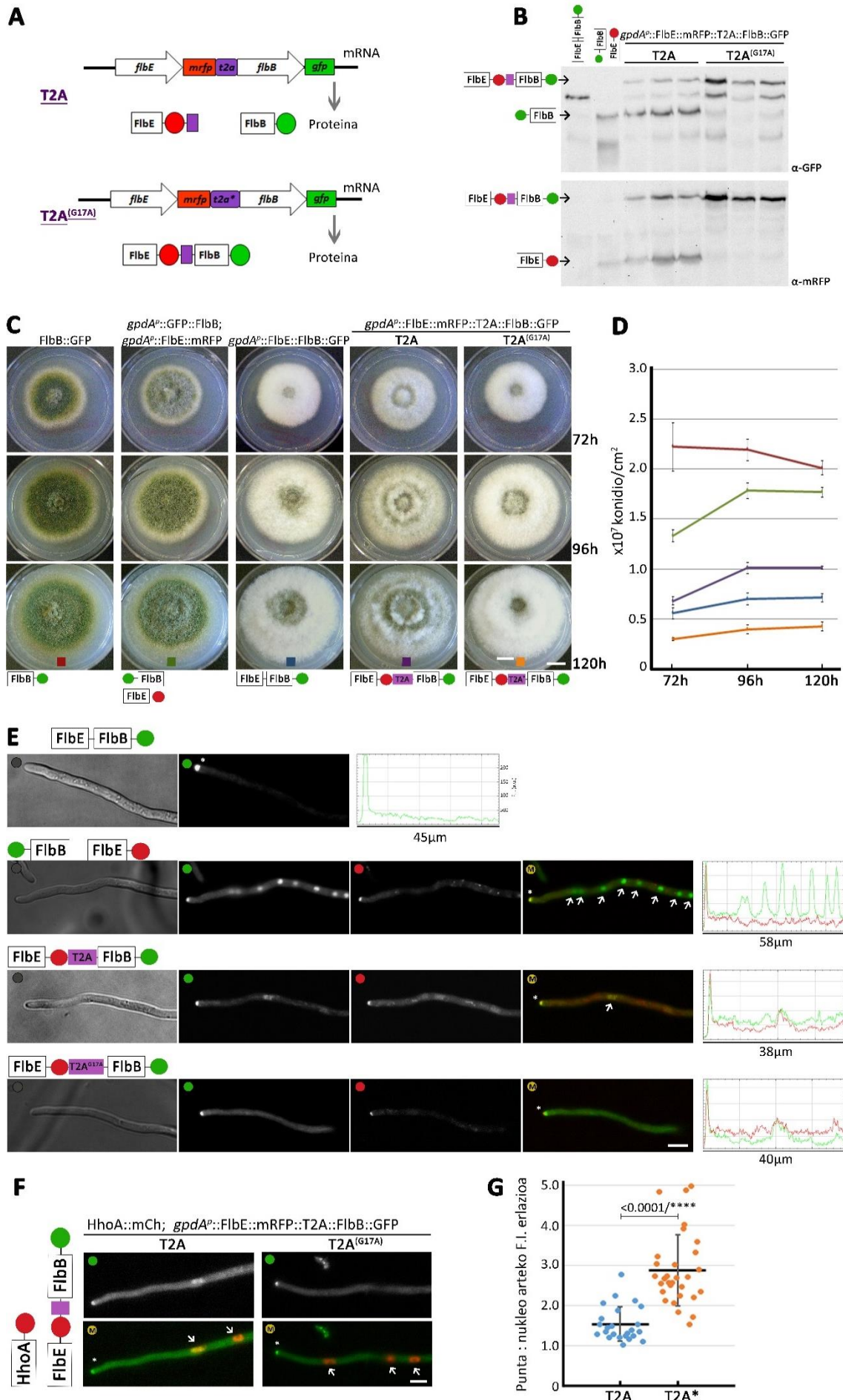
**3.3. irudia: FlbE eta FlbB arteko *pull-down* entseguak *in vivo* RFP-Trap erretxina erabiliz.** A) FlbE-ren proteina sekuentziaren hasieran, 1-33 aminoazidoen artean, seinale peptidoa izan litekeen eremua (E1) eta alaninaz ordezkatu zen W11 triptofanoa kokatzen dira. B) RFP-Trap<sup>®</sup> zutabeekin jarraitutako prozeduraren irudikapena. FlbE::mRFP (aldiera basatia nahiz W11A mutantea) erretxinera lotuta geratuko zatekeen, eta berarekin batera FlbE-rekiko interakzioa duten gainerako proteinak ere, (R) delako frakzioan. C) Burututako entseguak: *gpdA<sup>P</sup>::FlbE::mRFP*; *gpdA<sup>P</sup>::GFP::FlbB* kontrol anduiaren proteina erauzkinaz, eta bestetik, *gpdA<sup>P</sup>::FlbE<sup>(W11A)</sup>::mRFP*; *gpdA<sup>P</sup>::GFP::FlbB* mutantearen proteina erauzkinaz. *Coomassie* tindagaiaz tindatutako gelean, FlbE nahiz FlbE<sup>(W11A)</sup> erretxinera lotu zirela ikus daiteke (geziaz adierazten da dagokien banda). Azkenik behealdean, FlbB-ren immunodetekzio seinaleak erakusten dira,  $\alpha$ -GFP antigorputzarekin. R- frakzioan, FlbE aldaera basatiarekiko, FlbE<sup>(W11A)</sup> mutanteaz erretentzio-banda ahulagoa zen.

### 2.2.3. Behin hifaren puntan, FlbE eta FlbB arteko elkarrekintza inhibitzea beharrezkoa da FlbB nukleora itzuliko bada.

FlbB eta FlbE arteko elkarrekintza ezinbestekoa da bi proteinak hifaren puntara ailegatuko badira. Bide horretatik, Elixabet Perez de Nanclares Arregi doktoreak FlbE::FlbB::GFP kimera *gpdA<sup>P</sup>* promotorepean konstitutiboki adierazten zuen anduia sortu zuen. Fenotipo akonidiala zuen andui honetan, FlbE::FlbB fusio kimerak puntara ailegatzea lortzen zuen arren, kimera ezin izan zen nukleoetan detektatu (Otamendi *et al.*, 2019b). Hau, fluoreszentzia mikroskopia bidez aztertutako hifa guztietan gertatu zen ( $n = 45$ ). Beraz, badirudi, behin puntan direla, FlbB eta FlbE-ren arteko elkarrekintza inhibititu egin behar dela FlbB nukleora garraia dadin eta bertan konidiazioa erregula dezan.

Lan ildo honi jarraiki, eta Alba Ledesma GrAL-eko ikaslearekin kolaborazioan, *gpdA<sup>P</sup>* promotorepean FlbE::mRFP eta FlbB::GFP elkar fusionatu ziren tartean T2A izeneko peptido birala (EGRGSLTCDVEENPGP), edo honen T2A\* (EGRGSLTCDVEENPAP) forma mutatua, tartekatuz (ikus Materialak eta Metodoak kapitulu 6.2.1. atala; (Arribere *et al.*, 2016)). Peptido biral honi esker, mRNA-ren itzulpena gauzatu ahala, T2A-ren azken G17-P18 aminoazidoei dagokien kodoietara iristean, ordura arte osatutako kate peptidikoa askatu egiten da; baina erribosomak itzulpenarekin jarraitzen du bigarren peptidoaren sintesiaz (stop kodoieraino). Ondorioz, abiaburuko *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp* sekuentzia kodifikantetik, FlbE::mRFP eta FlbB::GFP bi kimera askeak adieraziko ziren teorian (3.4A goiko irudia). Konstrukzio genikoa,  $\Delta flbB$  andui baten *flbE locus*-ean txertatu zen, bi proteinen iturri bakarra berau izatea ziurtatzeko. T2A<sup>G17A</sup> aldaera mutatua kontrol negatibo gisa erabiliko zen, mutazioaren ondorioz bi kimeren forma fusionatua adieraziko baitzen (3.4A beheko irudia).

### 3. KAPITULUA:





**3.4. irudia: FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP kimerak (aldaera basatia edo T2A\* mutantea) adierazten dituzten anduien azterketa.** A) Itzulpenen *t2a* eta *t2a\** sekuentziek jokatzeko duten rola irudikapena. *gpdA<sup>p</sup>::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp* sekuentzia kodifikantetik bi kimerak aske sortuko dira. Aldiz, aldaera mutantearen kasuan kimerak fusionatua adieraziko da. B) Aztertutako anduien immunodetekzio probak. Kale bakoitzeko proteina erauzkinak: 1) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::FlbB::GFP* anduiarena; 2) *gpdA<sup>p</sup>::GFP::FlbB*; *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP* anduiarena; 3-5) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP* anduiaren 3 transformanterenak; eta 6-8) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP::T2A\*::FlbB::GFP* anduiaren 3 transformanterenak. Detekzioa  $\alpha$ -GFP (goian) eta  $\alpha$ -mRFP (behean) antigorputzez burutu zen, hurrenez hurren. Gezien bidez tamaina horri dagokien kimerak zeintzuk diren adierazten da. C) B ataleko anduien (gehi FlbB::GFP kimerak adierazten duen hirugarren kontrol bat) fenotipoak medio solidoan, 37 °C-tan hazten jarri eta 72, 96 eta 120 ordura. Eskala barra = 1 cm. D) C panelean azaldu diren anduien konidio ekoizpenak (konidio/cm<sup>2</sup>) irudikatzen dituen grafikoa, inokulaziotik 72, 96 eta 120 ordura. Balio bakoitza gutxienez hiru neurketen batez bestekoa da, gehi desbideraketa estandarra. E) FlbB eta FlbE proteinen lokalizazio subzellularra 1) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::FlbB::GFP*, 2) *gpdA<sup>p</sup>::GFP::FlbB*; *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP*, 3) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP*, eta 4) *gpdA<sup>p</sup>::FlbE::mRFP::T2A\*::FlbB::GFP* kimerak adierazten dituzten anduietan. Izartxoek hifen puntak adierazten dituzte eta gezienez bidez nukleoaren posizioak zehazten dira. Eskala barra = 5  $\mu$ m. Argazkien barruan, goian eta ezkerretara ageri diren zirkuluek mikroskopioan erabilitako filtroa adierazten dute. F) HhoA::mCherry nukleo markatzaileaz FlbB-ren lokalizazio nuklearra, edo honen gabezia, ziurtatu nahi izan zen T2A edo T2A\* fusio kimerak adierazten zituzten anduietan. Izartxoek hifen puntak adierazten dituzte eta gezienez bidez nukleoaren posizioak zehazten dira. Eskala barra = 5  $\mu$ m. G) T2A eta T2A\* anduien hifa desberdinetan neurtutako punta eta gertueneko nukleoaren fluoreszentsia intentsitateen arteko erlazioak erakusten dituen *scatter-plot* grafikoa. Puntu urdinak T2A aldaera basatiaren anduiari dagozkio, eta laranja G17A forma mutantea adierazten duen anduiari (T2A\*). Bi anduien fluoreszentsia erlazio desberdintasuna adierazgarria zen ( $p = 0.000000012$ ;  $n = 30$  eta 24 hifa andui bakoitzeko, hurrenez hurren).

Konstrukzioak genomak osorik eta dagokien *locus*-ean txertatu zirela ziurtatzeko *Southern-blot*-a eta *flbE locus*-aren sekuentziazioa burutu ostean, kimeren adierazpena zuzena zela baieztatu nahi izan zen immunodetekzioz (3.4B irudia). T2A-ren kasuan, bai GFP bai mRFP epitopoen immunodetekzioz, FlbB::GFP eta FlbE::mRFP kimerak detektatu ahal izan ziren, hurrenez hurren. Alabaina, kimerak bien tamainen baturari zegokion bigarren banda bat ere bereiz zitekeen. Banda honen lekuan agertu zen kontrol negatiboaren T2A<sup>G17A</sup> kimerari zegokion banda ere. Beraz, T2A peptido biralaren efizientzia ez da erabatekoa *A. nidulans* ondoan baina, bai nahikoa FlbB::GFP eta FlbE::mRFP kimeren populazio detektagarriak izateko.

Fenotipoari dagokienez, *t2a* konstrukzioa zeramaten anduiek neurri batean konidiazioa berreskuratu zuten (3.4C irudia), nahiz eta erreferentziazko andui basatietatik urruti egon. Hazten jarri eta 120 ordura, *gpdA<sup>p</sup>::flbE::mrfp*; *gpdA<sup>p</sup>::flbB::gfp* erreferentzia anduiak (bi kimerak aldi berean eta independienteki adierazten zituena)  $1.77 \cdot 10^7 \pm 0.05 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> kuantifikatu

### 3. KAPITULUA:

---

ziren, *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a::flbB::gfp* anduiaz  $1.04 \cdot 10^7 \pm 0.03 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> zenbatu ziren bitartean ( $p = 0.000024$ ;  $n = 3$  andui bakoitzeko). Edonola, azken kopuru hau aldaera mutantea zeramaten transformanteena edo FlbE::FlbB::GFP kimera adierazten zuen anduiarena baina handiagoa zen, *gpdA<sup>P</sup>::flbE::mrfp::t2a\*::flbB::gfp* anduiaz, esaterako,  $0.43 \cdot 10^7 \pm 0.04 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> zenbatu baitziren ( $p = 0.000032$  *t2a* aldaera basatiaz alderatuz;  $n = 3$  andui bakoitzeko) (3.4D irudia).

Fenotipo eta kuantifikazio horiek bat zetozen mikroskopia irudietan ikusten zen FlbB-ren lokalizazio nuklearraz (3.4E eta F irudiak). T2A peptido basatia adierazten zen kasuetan, FlbB nukleoan aurki zitekeen, nahiz eta *gpdA<sup>P</sup>::FlbB::GFP* kimera adierazten zuen anduiak baina maila apalagoan izan, eta gradiente baten arabera. Alegia, fluoreszentsia maila altuena hifen puntatik gertueneko nukleoan detektatzen zen, hurrengoetan fluoreszentsiaren intentsitatea jaisten zihoan bitartean. Aldiz, T2A\* aldaera mutanteaz ez zen fluoreszentsia nuklearrik detektatu (3.4E irudia). HhoA::mCherry nukleo markatzaileaz ziurtatu genuen ikusitako efektuak nukleoan posizioei zegozkiela (3.4F irudia). Hifen punta eta nukleoko fluoreszentsia intentsitateen arteko erlazioak aldaketa adierazgarria erakutsi zuten T2A-ren bi aldaeren anduietan. T2A forma basatiaz  $1.54 \pm 0.43$  zen artean, T2A<sup>G17A</sup> forma adierazten zuen anduiak  $2.88 \pm 0.90$ -ra igo zen ( $p = 0.000000012$ ;  $n = 30$  eta 24 hifa andui bakoitzeko, hurrenez hurren) (3.4G irudia). Bestalde, hifen puntan, bai GFP bai mRFP-ren fluoreszentsiak detektatu baziren ere, nukleoan ez zen FlbE::mRFP-ren presentzia antzeman. Beraz, eta orain arte proposatu den eredu molekularrarekin bat, badirudi, behin puntara iritsita FlbB eta FlbE arteko interakzioa inhibitua egin behar dela FlbB nukleora garraia dadin.

### 3. Eztabaida.

FlbB-k konidiazioan jokatzen duen rola dela eta, TF honen adierazpena nola erregula zitezkeen aztertu nahi izan zen kapitulu honetan. Proteinen sintesiaren erregulazioan transkripzio ondorengo mekanismoek berebiziko garrantzia izan dezakete. Horien artean, 5'-UTR eremuetan, ORF nagusiaren aurretik aurkitzen diren uORF eremuen bitartekaritza sarritan deskribatu da. Gizakietan, adibidez, transkriptoaren %50-ean uORF eremuak aurkitzen direla proposatu da eta hauek hainbat gaixotasunetan inplikaturik egon daitezkeela (Barbosa *et al.*, 2013). Eremu hauen eragite mekanismoak desberdinak izan daitezke. Adibidez, mRNA-ren egonkortasuna baldintzatu dezakete NMD bidea (*Nonsense Mediated Decay*) aktibatuz eta mRNA degradaraziz. Bestelako jardunbideak ere badira, erribosomaren funtzioan eraginez itzulpena erregulatzen dutenak, esaterako (Hood *et al.*, 2009). Mekanismoak anitzak izan daitezke azken honen barruan: 1) uORF hasiera kodoiaz itzulpen goiztiarra abiarazi daiteke, ORF nagusiaren itzulpenerako probabilitatea jaitsaraziaz. 2) Erribosomaren itzulpen berrabiarapena ere erregulatu daiteke; uORF-a zenbat eta luzeagoa izan honen itzulpenaren ostean 40S erribosoma subunitateak mRNA urbehera jarraitzeko probabilitatea txikiagoa da. 3) Erribosoma geldiarazi liteke uORF-aren azken kodoiean, honek ORF nagusiaren hasiera kodoira iristea galaraziko duelarik. Eta 4) uORF sekuentziaren luzapenean bertan erribosoma geldiarazi liteke.

Kapitulu honetan, FlbB-ren 5'-UTR eremuan aurkitzen ziren uORF-ak FlbB-ren proteina mailaren erregulatzailerik negatiboak izan zitezkeen aztertu zen. Eremu horien delezioak, baina, ez zirudien FlbB-ren adierazpena areagotu zuenik, *Western-blot*-ean nahiz mikroskopia irudietan ez baitzen FlbB-ren neurri goitiko presentzia detektatu. Fenotipoan ere ez zen erreferentzia anduiarekiko aldaketarik antzeman. Beraz, ez dirudi uORF horietako bat bera ere FlbB-ren erregulazioan diharduenik. Modu berean, hainbat ikerketetan ikusi izan da identifikatutako uORF guztiek ez dihardutela mRNA-ren itzulpenaren erregulazioan (Vilela eta McCarthy, 2003). Honen adibide, *Saccharomyces cerevisiae* onddoan, FlbB bezala bZIP motakoa

### 3. KAPITULUA:

---

den YAP1 TF-a kodetzen duen genearen promotoreak 7 kodoiko uORF bat darama. uORF honek ORF nagusiaren hasiera kodoian itzulpena berrabiaraztea baimentzen duela dirudi eta *yap1*-en mRNA-ren egonkortasuna ez duela kaltetzen. uORF honen mutatzek itzulpenean apenas eragiten duela ikusi da, beraz (Vilela *et al.*, 1998). Artikulu honetan bertan, uORF-en portaera desberdina azpimarratzen da, bestalde. Izan ere, *yap2*-ren kasuan, hau ere AP-1 motako TF-a kodetzen duen genea, bere promotorean dagoen uORF-ak *yap2*-ren itzulpena erregulatzen du bai erribosoma blokeatuz bai eta mRNA-ren egonkortasuna baldintzatuz. Edonola, *flbB<sup>p</sup>*-ren uORF-en parte-hartzea baztertu aurretik, aproposa litzateke bi eremuen mutante nulu sortzea, ea efektu gehigarriak egon litekeen.

uORF-en eragina ere inguruko baldintza fisiologikoen menpe egon daiteke (Vilela eta McCarthy, 2003). Hori dela eta, uORF-ek FlbB-ren erregulazioan diharduten determinatzeko, interesgarria litzateke baldintza eta garapenaren fase desberdinetan  $\Delta uORF1$  eta  $\Delta uORF2$  anduien (eta nulu bikoitzaren) RNA laginekin *Northern-blot* entseguak burutzea, *flbB*-ren ohiko adierazpen patroiak alderatuz. Medio likidoan proba fenotipikoak ere egitea komenigarria litzateke, konidioen formazio goiztiarrik ematen den ikusteko (hazkuntza medio likidoan konidiazioa inhibituta dago; Skromne *et al.*, 1995).

Bestalde, FlbB-ren sintesia kontrola lezaketen beste mekanismo eta bideen existentzia ere kontsideratu beharra dago. Aurrez ikertu izan da FlbB-ren proteina mailan UDA bideko beste Flb faktoreek eragina izan ote zezaketen, baina ez dirudi erregulazio mekanismo nagusia direnik. FlbD-rekin adibidez, honen gabeziaz *flbB*-ren ohiko mRNA adierazpen patroian garapen asexuala induzitu eta 6 orduetara bereizgarri den adierazpen piko nabarmena begiztatzen ez den arren, *flbB*-ren adierazpena antzeman daiteke (Garzia *et al.*, 2010). FlbC-ren kasuan, honen fondo genetiko nulu FlbB-ren presentzia detektatu izan da fluoreszentzia mikroskopian (Kwon *et al.*, 2010).  $\Delta flbE$  fondo genetikoan, *flbB*-ren adierazpena eta proteinaren sintesia baieztatu dira bai *Northern*- bai *Western-blot* entseguetan (Garzia *et al.*, 2009). *flbB* beraren 5'-UTR eremuan RNA-seq irakurketak badaude  $\Delta flbB$  fondo genetikoan ere (Garzia *et al.*, 2013; Oizartzabal-Arano *et*

*al.*, 2015). Honek, fondo genetiko nulo hauetan ere *flbB*-ren adierazpena kontrolatzen duten faktoreak aktibo daudela iradokitzen du. Horri *flbB*-ren mRNA adierazpen patroia aldakorra gehitzen bazaio (Etxebeste *et al.*, 2008), transkripzio mailan erregulazio mekanismo bat egon daitekeela iradokitzen du. Etorkizunean *flbB*-ren sintesia kontrola lezaketen TF-ak eta kromatinaren modifikatzaileak zeintzuk diren aztertu beharko litzateke baina, transkripzio ondorengo mekanismoen parte-hartze hipotetiko bati uko egin gabe.

Behin sortuta, FlbB-k garapen asexualari bide emango dion *brlA*-ren transkripzioa indusituko badu, aurrez puntara ailegatu behar du. Horretarako ezinbestekoak diren FlbE-ren bitartekaritza eta garraio akropetal mekanismoa ere aztertu nahi izan dira kapitulu honetan. Doktorego tesi hau hasterako ezaguna zen FlbB-ren C272A eta C382A zisteina-alanina mutazioek onddoaren fenotipo akonidiala eragiten zutela, eta fenotipo hori hifen puntako deslokalizazioarekin bat zetorrela (Herrero-Garcia *et al.*, 2015; Otamendi *et al.*, 2019). Lan honetan burutu ziren *pull-down* entseguetan C272A mutazio sinpleak nahiz bikoitzak (C272A;C382A), FlbB-k FlbE erretentitzeko gaitasuna ahuldu zuten baina ez zuten guztiz inhibitu. Beraz, badirudi zisteinak ez direla ezinbestekoak FlbE-rekiko elkarrekintzan. Alabaina, mutazio horien ondorioz FlbB-k, baita FlbE-k ere, puntan duten lokalizazioa galdu izanak bi zisteinek funtzio biologiko garrantzitsua dutela erakusten du. Bada, C272 eta C382-k FlbB/E konplexua garraio akropetalaren mekanismora gehitzeko helduleku gisa jardun lezakete edo puntan mintza edo bestelako egitura batekin lotzeko baliatu litezke.

Hain zuzen, zisteinen parte-hartzea determinatzeko, ea garraio eta lokalizazio apikalean diharduten edo esklusiboki FlbE-rekiko interakzioan funtzio sekundario (ez ezinbesteko) bat duten, *gpdA<sup>P</sup>::FlbE::FlbB<sup>(C272A;C382A)</sup>::GFP* kimera adierazten duen anduia sor liteke. Izan ere, Elixabete Perez de Nanclares doktoreak sortu zuen bi proteinen kimera fusionatua, *gpdA<sup>P</sup>::FlbE::FlbB::GFP*, gai zen puntara ailegatzeko. Beraz, ez zirudien FlbE::FlbB::GFP kimera horren konformazioak puntaranzko garraioa oztopatzen zuenik (Otamendi *et al.* 2019). Bada, proposatutako zisteina mutantedun kimera fusionatua puntara ailegatuko balitz, mutazioek

### 3. KAPITULUA:

---

esklusiboki FlbB eta FlbE arteko interakzioan, eta modu ez-ezinbestekoan, parte-hartzen dutela frogatu liteke. Modu berean, orain arte FlbB nahiz FlbE-n identifikatu diren eta lokalizazio apikalaren galera eragiten duten zenbait mutazio aldaera fusionatu efektu honetan errepikatuko balira, interakzioan edo/eta garraioan diharduten bereizteko aukera eskainiko luke.

Garraio akropetalean, FlbB-ren rola ez ezik FlbE-rena ere aztertu izan da. Hain zuzen, ustezko seinale peptidoari dagokion eremua (1-33), beharrezkoa bai, baina ez da nahikoa FlbB/E konplexua puntara ailegatzeko eta, ondorioz, onddoak konidia dezan (Otamendi *et al.*, 2019). Ustezko seinale peptido horrek xixku bidezko garraioa eman daitekeela iradokitzen du. Laborategian martxan jarritako *pull-down in vivo* (bakarrik *A. nidulans*-en proteina erauzkinak erabiliz) entseguan frogatu ahal izan dugu FlbE eta FlbB arteko elkarrekintza badela. Edonola, FlbE-ren W11A mutazioak elkarrekintza hori txikiagotzen du. Alabaina, W11A mutantearen fenotipo akonidialaren zergatia bi proteinen arteko interakzio galeran bakarrik ez, garraio mekanismoaren kaltetzean ere egon liteke. Izan ere, peptido seinale bat bagenu eta mutazioak eremuaren funtzionalitatea kaltetuko balu, FlbE garraio mekanismoarekin lotu ez, eta ondorioz, FlbB/E konplexua puntara iristea ekidingo luke, adibidez, FlbB-ren egonkortasuna txikituz edo/eta degradaziora bideratuz. RFP-Trap erretxinaz burututako estrategia hau baliagarria izan liteke FlbB/E-ren garraioan diharduten elementu gehiago identifikatzeko. FlbE<sup>(W11A)</sup>::mRFP mutantea erabil liteke kontrol negatibo gisa, eta aldaera basatiaz identifikatutako elementuen artean garraioarekin lotuta leudekeenak funtzionalki ezaugarritu ahalko liriteke. Interaktoreen izaera garraio mekanismoa determinatzeko giltzarri garrantzitsua izan liteke. Zentzu honetan, aurre saiakera bat egin da, GFP-Trap eta RFP-Trap zutabeetan *gpdA<sup>p</sup>* promotorepean adierazitako GFP::FlbB edo FlbE::mRFP aberastuz, eta erretenitutako frakzioan gelditutako proteinak masa espektrometria bidez identifikatuz. Prozedura optimizatu eta errepikakortasuna ziurtatzeari helduko zaio etorkizunean.

Bestalde, FlbB eta FlbE-ren arteko harreman funtzionala T2A (eta T2A\*) peptido biralaz aztertzeko egindako probetan lortutako emaitzen arabera, iradoki daiteke FlbB eta FlbE-ren

arteko interakzioa inhibitzea beharrezkoa dela FlbB bueltan nukleora garraiatua izan dadin. T2A aldaera mutantean, bai eta *gpdA<sup>P</sup>::FlbE::FlbB::GFP* adierazten duen anduian, FlbB ezin izan da nukleoetan detektatu. Etorkizuneko erronken artean, kanpo baldintzek hobesten dutenean, FlbB eta FlbE arteko interakzio hau nola inhibitzen den eta FlbB puntatik nola askatzen den ulertzea legoke. Edonola, T2A tresna molekular honek, hifen puntaranzko bidean beharrezko diren elementuak identifikatu eta ezaugarritzeko beste bitarteko bat eskaintzen du.

Behin hifen puntara iritsita bi proteinetako batek aldaketa konformazional bat jasan lezakeen aztertzea interesgarria litzateke. Hain zuzen, FlbE-ren poliprolina helize bat izan daitekeen eremuan mutazioa duen (D70A;D73A) mutante akonidial bat isolatu da (Otamendi *et al.*, 2019). Mutante honetan baina, FlbB eta FlbE konstitutiboki adieraztean konplexuaren lokalizazio apikala ez da erabat galtzen (3.1A eranskina). Poliprolina helizeek proteinen konformazioan nahiz seinaleen transdukzioan izan dezaketen funtzioa dela eta (Adzhubei *et al.*, 2013), Elixabet Perez de Nanclares doktoreak eremu honek seinalizazio apikalean parte har dezakeela proposatu zuen. Alabaina, *flbE*-ren fondo genetiko mutante honetan (*gpdA<sup>P</sup>::FlbE<sup>(D70A;D73A)</sup>::mRFP*) *flbB* promotore konstitutiboaz adieraztean, ez zegoen ziurtatzerik FlbB puntan kokatzen zenik (3.1B eranskina). Izan ere, FlbB-ren fluoreszentsia maila oso baxua zen eta, irudiren batean salbu, ez zen puntan hautematerik izan. Nukleo apikaletan ere ez zen FlbB-ren fluoreszentsia garbirik detektatu. Detektatzen zen arren, FlbE beraren presentzia apikala ere oso txikia zen. Konplexu proteikoaren ezegonkortasunak eragin lezake proteina maila baxu hori, eta honek aldi berean, konidio produkzioan beherakada (3.1C eranskina). Horrela, ezin izan zen eremu honen inguruko informazio gehiagorik lortu.

Mahai gaineratu zen beste aukeretako bat ustezko FlbE-ren ubikitinazioa izan zen. Izan ere, (Chu *et al.*, 2016) lanean, *A. nidulans* onddoaren laginetan ubikitinaturik agertzen ziren proteina guztien artean, FlbE bera ere bazegoela deskribatu zuten. Ubikitinazioa itzulpen ondorengo aldaketa mota bat da, non ubikitina molekula bat edo gehiagoz etiketatuko den proteina bat, lisina aminoazido bakarrean edo batzuetan (Kaiser eta Huang, 2005). Aipatutako

### 3. KAPITULUA:

---

lanaren arabera, FlbE 51. posizioako lisinan egongo litzateke ubikitinatua. Ubikitinazioa, degradazio mekanismo gisa sarritan deskribatu izan den arren, prozesu zelularretan proteinen interakzio, lokalizazio edo aktibitatearen erregulazio mekanismo gisa jardun daiteke ere (Schnell eta Hicke, 2003). Hipotesi gisa, FlbE-ren ubikitinazioak proteinen degradazioa eragin eta honela FlbB-ren askatzea baimenduko ote lukeen proposatu zen, TF-a nukleoetara irits zedin. Honi erantzutearren FlbE-ren K51 aminoazidoa mutatzeko baztertu zen, FlbE-k bere sekuentzian beste sei lisina izanda, horietako edozein izan baitzitekeen ubikitinatua K51-ren faltan. Horrela, GFP::FlbB, HA<sub>3x</sub>::Ubi4 (Noventa-Jordão *et al.*, 2000) eta FlbE::mRFP kimerak hiruak aldi berean eta *gpdA<sup>P</sup>* promotorearen eraginpean adierazten zituen anduia sortu zen *pull-down* entseguak (*in vivo*; *A. nidulans*-en proteina erazkinak erabiliz) burutzeko (Emmerich eta Cohen, 2015; Ramirez *et al.*, 2016). FlbE ubikitinatua balego, FlbE::mRFP kimerari dagokion tamainatik (~47 kDa) apur bat gorantz, HA<sub>3x</sub> seinalea edo seinaleak (*smear* moduan) detektatzea esperoko litzateke, monoubikitinazio edo poliubikitinazioaren adierazle (Ramirez *et al.*, 2016). Egindako probetan ez zen hasiera batean espero zitekeen monoubikitinazio edo poliubikitinazio zantzu argirik (Emmerich eta Cohen, 2015) antzeman frakzio erretentuan aurkitzen zen FlbE proteinaz (3.2 eranskina). Entseguak ubikitinazioaren aukera babes zezaketen emaitza adierazgarrikerak erakutsi ez arren, kontrolaren aldean frakzio erretentua ez zen hain garbia, eta HA<sub>3x</sub>-en banda ugari detektatu ziren pisu molekular handitan. Izan liteke ubikitinazioa detektatzeko baliatutako tratamenduak (NEM, N-etilmaleimida, konposatua desubikitinazioa ekiditeko erabilia eta MG132 proteosoma inhibitzailea) FlbE-rekin interakzioa izan lezaketen interaktore ubikitinatuak azalaraztea eta ondorioz *Western-blot*-ean seinalea ikustea. Egun emaitza argirik ziurtatu ezinez, etorkizunean lan-baldintzak optimizatu beharko lirateke, hasteko kontrol positibo bat gehituz. Bestalde, (Chu *et al.*, 2016) lanean ubikitinazioa aztertzeke baliatu zituzten lan eta hazte baldintzak errepikatzea komeniko litzateke, ez dadin izan FlbE-ren ubikitinazioa nagusiki ondoaren hazkuntza edo garapen fase jakin batean ematea.



**4.KAPITULUA:**  
**FlbB-ren garraio basipetala eta metaketa**  
**nuklearra *brlA*-ren transkripzioa**  
**erregulatu ahal izateko**



## 1. Sarrera.

FlbB-k, TF bat den heinean, transkripzio erregulatzailerako funtzioa beteko badu, nukleora iritsi eta bertan akumulatu behar du. Jakina da FlbB hifen puntan aurkitzeaz gain nukleoetan ere aurkitzen dela, puntatik gertueneko nukleotik urrutienekoetara FlbB-ren presentzia gutxiagotzen doalarik (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Aurreko emaitzek noranzko honetako garraio basipetala ematen dela iradoki izan dute (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014). Alabaina, egun oraindik ez da ezagutzen FlbB-ren garraio basipetal hipotetiko hau nola gauzatzen den. Ildo honetatik, FlbB-ren sekuentzia peptidikoan NLS (*Nuclear Localisation Signal*) eremua izan zitekeena identifikatu zen (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), KR/KK-X(10-12)-KRRG NLS sekuentzia bipartita kontsentsuaz (Fontes *et al.*, 2003) kontserbazio maila handia zuena eta FlbB-ren metaketa nuklearrerako beharrezko zena (57-KKTTRDGQPAKRRG-70). NLS eremuek proteina (kargoa) nukleora garraiatzeko seinale gisa dihardute eta eremu honetara  $\alpha$ -inportina lotu ohi da, poro nuklearretan zehar (NPC) proteinaren barneratzea bideratuko duen karioferinetako bat, hain zuzen. Izatez,  $\alpha$ -inportina proteinak adaktadore funtzioa betetzen du eta benetan  $\beta$ -inportina da garraiolari lanak egiten dituen,  $\alpha$ -inportina garraiatuko den kargora eta  $\beta$ -inportinara lotzen den bitartean bien arteko uztarri lanak eginaz. FlbB-ren baitan aurkitzen den ustezko NLS seinalea dela eta, kapitulu honetan  $\alpha/\beta$ -inportinek FlbB-ren garraio basipetalean nahiz metaketa nuklearrean izan lezaketen ustezko parte-hartzea aztertu nahi izan da. Hain zuzen, *A. nidulans* ondoaren  $\alpha$ -inportina KapA izenaz ezagutzen da (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2011); eta gainera, KapB-rekin batera ( $\beta$ -inportina), hifen zitoplasman zehar bi noranzkoetan desplazatzen den inportina ezagun bakarra da (Etxebeste *et al.*, 2013). Hori dela eta, kapitulu honetan KapA inportinaz hainbat esperimentu proposatu dira.

Bestalde, dineina proteina motoreak FlbB-ren garraioan izan lezakeen rola ere aztertu nahi izan da. Dineina zelula barruko hainbat kargoren garraiolari ezaguna da, eta gainera dineina/dinaktina konplexuaren bitartekaritza KapA-ren garraioan nahiz haren metaketa nuklearrean beharrezkoa dela ere deskribatu izan da (Etxebeste *et al.*, 2013).

#### 4. KAPITULUA:

---

Behin punta-nukleo arteko bidea burututa, nukleoan, FlbB-k FlbD-rekin elkarlanean (Myb motako bigarren TF bat; Wieser eta Adams, 1995; Adams *et al.*, 1998) *brlA*-ren transkripzioa indultzten du (Garzia *et al.*, 2010). BrIA konidiazioa aurrera eramateko CDP bideko ezinbesteko TF-a izaki, FlbB eta FlbD-ren parte hartze eta koordinazio egokiak ezinbestekoak dira konidioen sintesiaren kontrolean. Bi TF-ak *brlA*-ren promotorera lotzen dira, baina oraindik ez da ezagutzen lotze mekanismoa. Transkripzio lanetan ez ezik, FlbD beharrezkoa da FlbB nukleora barnera dadin. *flbD* fondo genetiko nuluari FlbB nukleoetatik kanpo aurkitzen da eta *patch* mugikorrek bereiz daitezke bi noranzkoetan mugituz (Otamendi *et al.*, 2019). FlbB *patch* mugikorren agerpenak  $\Delta flbD$  fondo genetiko tresna aproposa bihurtzen du FlbB-ren dinamika zelularra aztertzeko. Kapitulu honetan, aipaturako alderdiak aztertzeko, fondo genetiko hau ere baliatuko da.

## 2. Emaizak.

### 2.1. FlbB-ren garraio basipetala hifen puntatik nukleora.

#### 2.1.1. KapA, $\alpha$ -inportinaren, ustezko bitartekaritzaren azterketa FlbB-ren punta-nukleo arteko garraioan eta metaketa nuklearrean.

FlbB-ren K57 eta G70 aminoazidoen artean kokatzen den KK-X(8)-KRRG sekuentziak NLS lana bete zezakeela proposatu zen (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Sekuentzia honek (Fontes *et al.*, 2003) lanean deskribatutako bi zatitako KR/KK-X(10-12)-KRRK NLS kontsentsuaz parekotasun handia zuen. FlbB-ren ortologoetan zuen kontserbazio maila altuak eremu hau TF honen funtziorako garrantzitsua izango zela babesten zuen (Cortese *et al.*, 2011). Ustezko NLS eremu honen jarduna aztertzearen, Elixabete Oiartzabal Arano doktoreak K67 eta R68 aminoazidoak mutatu zituen. FlbB<sup>(K67A,R68A)</sup> mutanteak, FlbB<sup>(NLS\*)</sup> moduan ere izendatuko denak, konidiatzeko gaitasuna galdu zuen kultura medio estandarrean, *flbB* nuloaren pareko fenotipoa aurkeztuz; bestalde, FlbB-ren lokalizazio nuklearra ere nabarmen kaltetu zen (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Guztiaz, ustezko NLS eremua FlbB nukleoetan aurkitzeko beharrezko zela erdietsi zuten.

FlbB-ren baitan NLS kontsentsu eremu baten presentziak, KapA inportina eremu hauetara lotu eta FlbB-ren garraio basipetalean nahiz metaketa nuklearrean eragin zezakeen aztertzeraz eraman gintuen. Izan ere, (Etxebeste *et al.*, 2013) lanean  $\alpha/\beta$ -inportina konplexua inportazio nuklear lanetan ez ezik, distantzia handiko garraio zitoplasmikoan ere aritu zitekeela proposatu zen. Kapitulu honetan, hainbat estrategia eta esperimentu proposatu ziren KapA-k eta FlbB-k izan zezaketen harreman funtzionala aztertzeko.

#### 2.1.1A. NLS eremuko K67A eta R68A mutazioek ez dute $\Delta flbD$ fondo genetikoan FlbB-ren dinamika zitoplasmikoa inhibitzen.

NLS eremuaren K67 eta R68 aminoazidoen aldaketak FlbB-ren lokalizazio nuklearra kaltetu bazuen ere (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), efektu hau zein mailatan ematen zen aztertu nahi izan zen. Alde batetik, efektua FlbB-ren garraio basipetalaren inhibizioak eragin ote zezakeen, edo bestetik, FlbB-ren inportazioaren inhibizioak. Sarreran azaldu bezala,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB-ren dinamika aztertzeko tresna genetiko aproposa da, FlbB-ren *patch* mugikorrek detekta baitaitezke eta haien ibilbidea jarraitu (Otamendi *et al.*, 2019b). Bada,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP kimera adieraziko zuen anduia sortu eta FlbB mutantearen dinamika behatzea proposatu zen, ea punta eta nukleo arteko garraioa inhibitua izan zitekeen, beti ere FlbB::GFP kimera basatiarekin alderatuz.

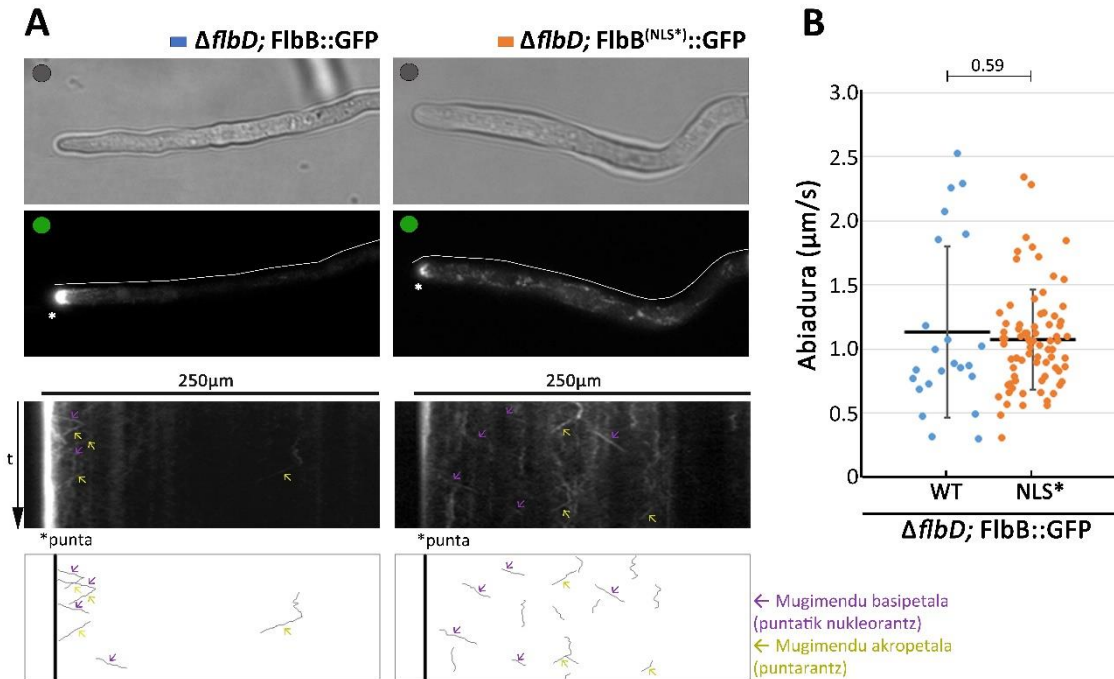
Fluoreszentzia behaketetan ez zirudien FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP-ren dinamika zitoplasmikoa kaltetu zenik,  $\Delta flbD$  anduian ikusi ohi ziren FlbB::GFP *patch* estatiko nahiz mugikor berak antzeman baitziren, azken horiek bi noranzkoetan mugitzen zirelarik (ikus 4.1A irudia eta 4. bideoak). Are gehiago, FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP *patch* hauek garbiago edo erraztasun handiagoz ikustearen errezeloa izan genuen. Hori dela eta, andui bakoitzeko hifetan aurki zitezkeen *patch* mugikorrek kuantifikatu nahi izan ziren. Kontaketa saiakera bat burutu zen arren, fluoreszentzia maila baxuak nahiz hifa batetik besterako *patch* kopuruaren aldakortasunak balio bat ziurtasunez

#### 4. KAPITULUA:

---

ematea zaildu zuten. Hala ere, begi hutsez, FlbB<sup>(NLS\*)</sup> aldaera mutantearen *patch* gehiago ikus zitezkeela pentsatzen jarraitzen genuen. Horregatik, jarraian FlbB forma basatiaren eta mutantearen *patch* mugikorren abiadurak konparatzea erabaki zen. Horretarako, fluoreszentzia irudi sekuentzietatik (*stack*-ak), *patch*-k identifikatu eta horien ibilbideak jarraituz kimogramak osatu ziren (ikus 4.1A irudian, behean; goiko parteko fluoreszentzia irudiak *stack*-en proiektzio maximoei dagozkie). Kimogramek ibilbide jakin baten zeharreko fluoreszentzia (distantzia) denborarekin nola aldatzen den irudikatzen dutenez, FlbB-ren *patch* bakoitzaren ibilbidea (norantza, akropetala edo basipetala) eta abiadura erdietsi daitezke, malda txikieneko lerroek abiadura handieneko *patch*-ak adierazten dituztelarik. Abiadura neurketek FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP *patch*-en batezbesteko abiadura  $1.07 \pm 0.39 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  zela erakusten zuten, erreferentziako FlbB::GFP *patch*-ena  $1.13 \pm 0.67 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ -ekoa zen bitartean ( $n = 77$  eta  $23$  *patch*, hurrenez hurren; 4.1B irudiko grafikoa). Estatistikoki,  $p$ -ren balioa ( $p = 0.59$ ) ez adierazgarria izateaz gainera ( $< 0.05$ ), desbideratze estandarrek errore tarteak elkar gainjartzen zirela erakusten zuten eta, beraz, ezin genezakeen esan abiadura aldaketa esanguratsurik gertatu zenik.

*Aspergillus nidulans*-en kargo eta xixkuen garraio zitoplasmatikoa azaltzen duen ereduak, apize eta subapizearen arteko garraioa aktina zuntzetan zehar ematen dela dio, subapize eta urrutiko eremuen arteko garraioa mikrotubuluetan (MT) zehar ematen dela dioen bitartean (Takeshita *et al.*, 2014).  $\alpha$ - eta  $\beta$ -importinek MT-etan zehar burutzen dute euren mugimendu zitoplasmatikoa (Etxebeste *et al.*, 2013). Hori dela eta, lan honetan, apize-subapize arteko eremuan, batetik, eta MT-ak luzatzen direneko eremuan, bestetik, mugitzen ziren *patch*-ak bereizi nahi izan ziren. Apize-subapize eremuko *patch* mugikorren kasuan batezbesteko abiadurak antzekoak ziren erreferentzia eta NLS\* anduietan ( $p = 0.42$ ;  $n = 16$  eta  $34$  *patch*, hurrenez hurren). Punta ingurutik kanpo mugitzen ziren *patch*-k soilik aintzakotzat harturik ere ez zen aparteko aldaketarik antzeman ( $p = 0.75$ , ez-adierazgarria;  $n = 7$  eta  $43$  *patch*, hurrenez hurren). Azkenik, mugimendu akropetala edo anterogradua zuten *patch*-en artean aldaketarik egon zitekeen aztertu zen, baina hemen ere ez zen aldaketa esanguratsurik baieztatu.



**4.1. irudia:  $\Delta flbD$  fondo genetikoan  $FlbB^{(NLS^*)}::GFP$ -ren dinamika zelularra.** A)  $\Delta flbD$  fondo genetikoan  $FlbB::GFP$ -ren (erreferentzia) eta  $FlbB^{(K67A;R68A)}::GFP$  NLS mutantearen dinamikaren azterketa irudikatzen du fluoreszentsia *stack*-etatik abiatuz lortutako proiektzio maximoak erakusten dira (Z-MAX; fluoreszentsia intentsitate handieneko puntuak biltzen dira irudi bakarrean), fase kontraste irudiekin batera (DIC). Beheko kimogramek *FlbB patch*-en ibilbideak irudikatzen dituzte (gezi moreek garraio basipetala adierazten dute, eta horiek akropetala). Modu berean, kimogrametan bereizten ziren *patch* nagusien lerroak bigarren irudi batean irudikatu dira argi bereiz daitezkeen. x ardatzak posizioa eta y ardatzak denbora adierazten dituzte. Kimogrametako lerro jarrai horien maldak zenbat eta txikiagoa izan abiadura handiagoa da. Erreferentzia anduiaz bezala,  $FlbB^{(K67A;R68A)}::GFP$ -ren kasuan ere *patch*-n mugimendua hauteman zen. B) *Patch*-n abiadurak irudikatzen diren grafikoa. Erreferentziazko anduiaz  $1.13 \pm 0.67 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ -ko batezbesteko abiadura erdietsi zen ( $n = 23$ ), eta  $FlbB^{(NLS^*)}::GFP$ -ren kasuan  $1.07 \pm 0.39 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ -koa ( $n = 77$ ).

Emaitzak esku artean, ez dago esaterik FlbB-ren NLS eremuko K67A eta R68A aminoazidoen aldaketek proteinaren dinamika zitoplasmatikoa aldatzen dutenik, nahiz eta interesgarria litzatekeen *patch* mugikorren kopuruak ea benetan gora egin duen aztertzea. Edonola ere, ez dirudi (Herrero-Garcia *et al.*, 2015) lanean deskribatu zen lokalizazio nuklearraren galera, NLS\* mutazioek FlbB-ren garraio basipetalaren abiadura txikitu izanaren ondorioa denik. Beraz, NLS-aren mutazio espezifikoek (K67A; R68A) FlbB-ren barneratze nuklearraren urratsean eragin dezaketela ematen du, proteinaren metaketa nuklearra eragotziz (Herrero-Garcia *et al.*, 2015).

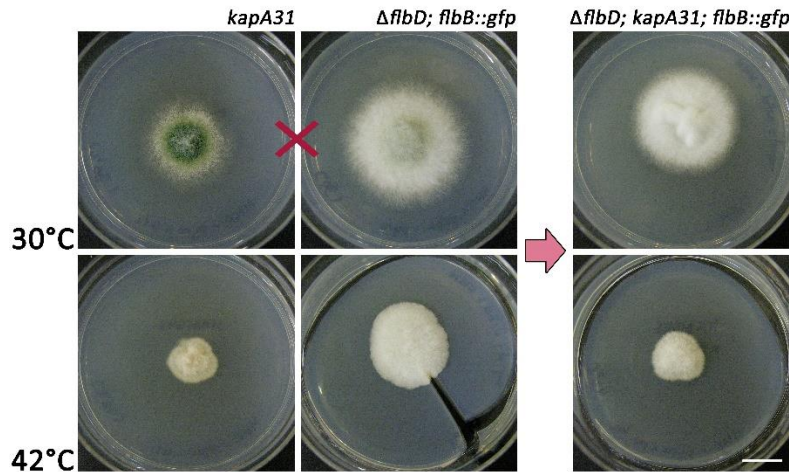
#### 4. KAPITULUA:

---

2.1.1B.  $\Delta flbD$  fondo genetikoan  $kapA31$  mutazio termosentikorak ez du, antza, FlbB-ren lokalizazioan eta dinamikan aldaketarik eragiten.

Aurreko emaitzetatik KapA inportinaren funtzioa, FlbB-ri dagokionean, zein izan zitekeen iradoki ezin zenez, azterketarekin jarraitzeko begirada KapA berarengan jartzea erabaki zen. Alabaina, KapA inportinaren gabezia hilgarria da *A. nidulans* ondoarentzat (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2011) eta, ondorioz, KapA-ren jarduna aztertzeko bestelako tresna genetikoak sortu behar izan ziren. Honela, Lidia Araújo Bazán ikertzaileak  $kapA31$  mutazio termosentikorra zeraman anduia sortu zuen, 42°C-tan inportadorearen funtzio galera eragiten zuena (Araújo-Bazán *et al.*, 2009). Hala, FlbB-ren dinamika aztertu nahi izan zen  $kapA31$  mutazio termosentikorraren eraginpean. Dinamika aztertu ahal izateko,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan eraiki zen FlbB::GFP kimera adierazten zuen  $kapA31$  andui mutante berria. Bestalde, kontutan hartu behar da  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB nukleotatik kanpo geratzen dela eta, beraz, ez da hau andui egokia barneratze nuklearra aztertzeko. Andui berria sortzeko  $\Delta flbD; flbB::gfp$  (BD209) eta  $kapA31$  (MAD1545; Araújo-Bazán *et al.*, 2009) anduiak gurutzatu ziren, eta ondorengo andui termosentikor egokiak isolatu eta identifikatu ziren hazkuntza gaitasunaren arabera (ikus Materialak eta Metodoak kapitulua, 1.1. atalean eta 7. atala). 4.2. irudian ikus daitekeen bezala, 42°C-tan kolonia diametro txikiagoko anduiak bereizi ziren  $kapA31$  genotipodun hautagai gisa. MCA-tan ere aztertu zen andui horien hazkuntza, diametro alde nabarmenak deskribatu zirelarik erreferentziarako  $\Delta flbD; flbB::gfp$  anduiarekiko (ez da erakusten).





**4.2. irudia:  $\Delta flbD$ ; *kapA31*; *flbB::gfp* anduiaren fenotipoa.** *kapA31* eta  $\Delta flbD$ ; *flbB::gfp* anduien gurutzapenetik lortutako ondorengoan artean, *kapA31* aldaera mutantea zeramatzen hautagaiak bereizteko, horien hazkuntza tamaina (42°C-tan) aztertu zen. Jatorrizko *kapA31* parentalaren moduan, ohikoa baino kolonia diametro txikiagoko ondorengoak bereizi ziren.

Fluoreszentzia behaketa burutzeko tenperatura errestrikzioa 37°C-tan ezarri zen, 42°C-tan egin beharrean. Izan ere, aurrez laborategian, *kapA31* fondo genetikoan FlbB::GFP kimera adierazten zuen anduiak (BD808) egindako probetan, kontrol andui basatiak berak (*kapA*<sup>+</sup> fondo genetikoa) 42°C-tan FlbB-ren lokalizazio nuklearra galtzen zuela ikusi zen. Bestalde, 37°C-tan *kapA31* eta *kapA31*; *flbB::gfp* anduiak *fluffy* fenotipoa zuten (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Beraz, pentsa zitekeen tenperatura honetan mutazioak aktibo ziharduela (KapA-ren funtzio galera eraginez). Hori dela eta, behaketak 28°C eta 37°C-tan egin ziren, tenperatura permisibo eta errestrikzio gisa, hurrenez hurren.

Fluoreszentzia mikroskopia behaketetan ez zen estatistikoki esanguratsua zen aldaketarik antzeman. Tenperatura errestrikzioan, 37°C-tan, ziurtatu ahal izan zen erreferentziako  $\Delta flbD$ ; *flbB::gfp* anduiak mugitzen ziren *patch*-ak bazirela. Horien abiadura neurketek ez zuten aldaketa estatistiko adierazgarririk azaleratu 28°C eta 37°C-tako bi lan tenperaturen artean ( $0.98 \pm 0.38 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  eta  $0.90 \pm 0.36 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $p = 0.50$ ;  $n = 27$  eta 14 *patch*, hurrenez hurren). *kapA31* fondo genetiko termosentikorrean eta 37°C-tan, *patch* mugimendua antzeman zitekeen arren, neurketak egiteko ibilbidea jarraitu nahi izan zenean lan nekeza suertatu zen. *Stack* urritasun eta *patch* mugikor egonkorak identifikatzeko zailtasunaren

#### 4. KAPITULUA:

---

ondorioz, apenas lortu ziren neurketa gutxi batzuk baldintza hauetan. *kapA31* fondo genetikoan  $0.76 \pm 0.40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  batezbesteko abiadura lortu zen  $37^\circ\text{C}$ -tan, eta temperatura berean erreferentziako anduiarekin alderatuz  $p = 0.36$  balio ez-adieragarria erdietsi zen ( $n = 7$  *patch*-en abiadurak). Edonola ere, neurketa kopuru esanguratsu baten faltan, eta *kapA31* mutazio sentikorraren eraginez  $37^\circ\text{C}$ -tan KapA-ren funtzio galera erabatekoa den jakin ezean, zaila da ondoriorik ateratzen esperimendu honetatik.

##### 2.1.1C. KapA eta FlbB proteinen artean interakzio genetikoa egon liteke.

FlbB-ren ustezko garraio basipetalean KapA-k esku-hartu zezakeen argitze aldera, bi proteinak elkarrekin mugitzen ziren aztertu nahi izan zen. Horretarako, tesi honetan zehar bi proteinak batera adierazten zituzten hainbat andui sortu zen parental egokien gurutzapenetatik. Batetik, KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimerak adierazten zituzten anduiak sortu ziren fondo genetiko basatian, bai eta  $\Delta flbD$  fondo genetikoan ere. Eta bestetik, KapA::mRFP-z batera FlbB<sup>(K67A,R68A)</sup>::GFP kimera adierazten zuen anduia sortu zen, NLS eremu mutatuak ustezko dinamika bateratuan eragin zezakeen aztertzeko. KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimerak fondo genetiko basatian adierazten zituzten ondorengo fenotipoari erreparatuz (gainerako genotipokoek espero zitekeen *fluffy* fenotipoa baitzuten), bazirudien konidiazioa kaltetuta egon zitekeela (4.3A irudia). Beharbada, etiketa bikoitzak efektu bat izan zezakeen onddoarengan, bakarkako parentaletan hautematen ez zena.

Andui berriak fluoreszentzia mikroskopian aztertzeko momentuan, *dual view* izeneko gailua erabili zen. Gailu honek argi intzidentea bitan banatzen du, bakoitzarekin filtro desberdina erabiltzen duelarik, bata GFP-ren eta bestea mRFP-ren emisioa detektatu ahal izateko. Era honetan, fluoreszentziarako bi kanal edukirik, une berean bi proteinen lokalizazioa aztertu nahi izan zen, (Etxebeste *et al.*, 2013) lanean KapA eta KapB inportinekin egin zen bezala. Bi proteinak espero zen lokalizazioetan detektatu ziren arren (FlbB hifen punta eta nukleo apikaletan, eta KapA nukleoetan; 4.3B irudia), tamalez, ez zen aldi berean bi proteinen dinamika zitoplasmikoa

jarraitzeko aukerarik egon, hein batean FlbB-ren fluoreszentsia baxuak (promotore natiboarekin adierazten ari baitzen) bi proteinen lokalizazioaren konparaketa zail egin baitzuen, baita  $\Delta flbD$  fondo genetikoan ere (ez erakutsia). Akaso, fenotipoaz ikusi bezala, etiketatze bikoitzak anduien proteina mailan, eta ondorioz fluoreszentsian, ere eragin izan zezakeen.

#### 2.1.1D. *Pull-down* entseguetan KapA eta FlbB elkar ahulki erretenitzeko gai dira.

Fluoreszentsia mikroskopiaren mugak ikusirik, eta KapA eta FlbB arteko ustezko harremana aztertzen jarraitzeko, *pull-down* entseguen bitartez bi proteinen artean interakziorik egon zitekeen behatzea erabaki zen. Kapitulu honetan sortutako eta KapA::mRFP nahiz FlbB::GFP kimerak aldi berean adierazten zituen anduia baliatu nahi izan zen *pull-down* entseguak *in vivo* egiteko. Hirugarren kapitulan martxan jarri zen protokoloa jarraituz (ikus Materialak eta Metodoak kapitulan, 9.2.2. atala ), RFP-Trap<sup>®</sup> edo GFP-Trap<sup>®</sup> erretxinera mRFP edo GFP epitopodun proteina (aukeratutako zutabearen arabera) lotuko zen amu gisa. Eta jarraian honek bigarren proteina erretenitzeko gai ote zen aztertuko zen immunodetekzioz.

Lehen proba batean KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimerak aldi berean adierazten zituen anduiaren, BD1128-ren, proteina erauzkina erabili zen, baina FlbB-ren proteina adierazpen baxua zela eta, entsegu estrategia aldatu beharrean aurkitu genituen geure buruak. Honela, andui honen proteina erauzkinari *gpdA<sup>P</sup>::FlbB::GFP* plasmidoaren hiru kopia genomatikoki integratuak zituen (MAD4324; Herrero-Garcia *et al.*, 2015) andui baten erauzkina batu zitzaion, FlbB proteina kontzentrazio altuagoa eduki ahal izateko. Lehen entseguan, RFP-Trap<sup>®</sup> zutabeaz KapA::mRFP erretxinera lotu zen amu gisa, eta honek FlbB erretenitu ahal zuen determinatzen saiatu zen. GFP-ren immunodetekzioz, erretenitutako frakzioan (R) banda oso ahul bat detektatu ahal izan zen, 4.1. eranskinean (ezkerraldeko irudia, lauki berdea) ikus daitekeen moduan. Banda hain ahula izaki, prozesuan erretxina ondo garbitu ez eta proteina hondarrak egon zitezkeela pentsa zitekeen. Alabaina, *Coomassie* tindagaiaz aztertutako kontrol gelean, kontrol frakzio erretenituan ez zen proteina arrastorik antzeman. Kontrol gisa, zutabe beraz

#### 4. KAPITULUA:

---

(RFP-Trap®), *gpdA<sup>P</sup>::FlbB::GFP* anduiaren proteina erauzkina inkubatu zen, non erretxinean ez litzatekeen proteinarik lotu behar. Bestalde, bai *Coomassie*-n bai *mRFP-western-blot*-ean, erretenitutako frakzioan KapA-ren tamainako proteina banda begiztatu zen; itxura batean, beraz, KapA erretxinera ondo lotu zen.

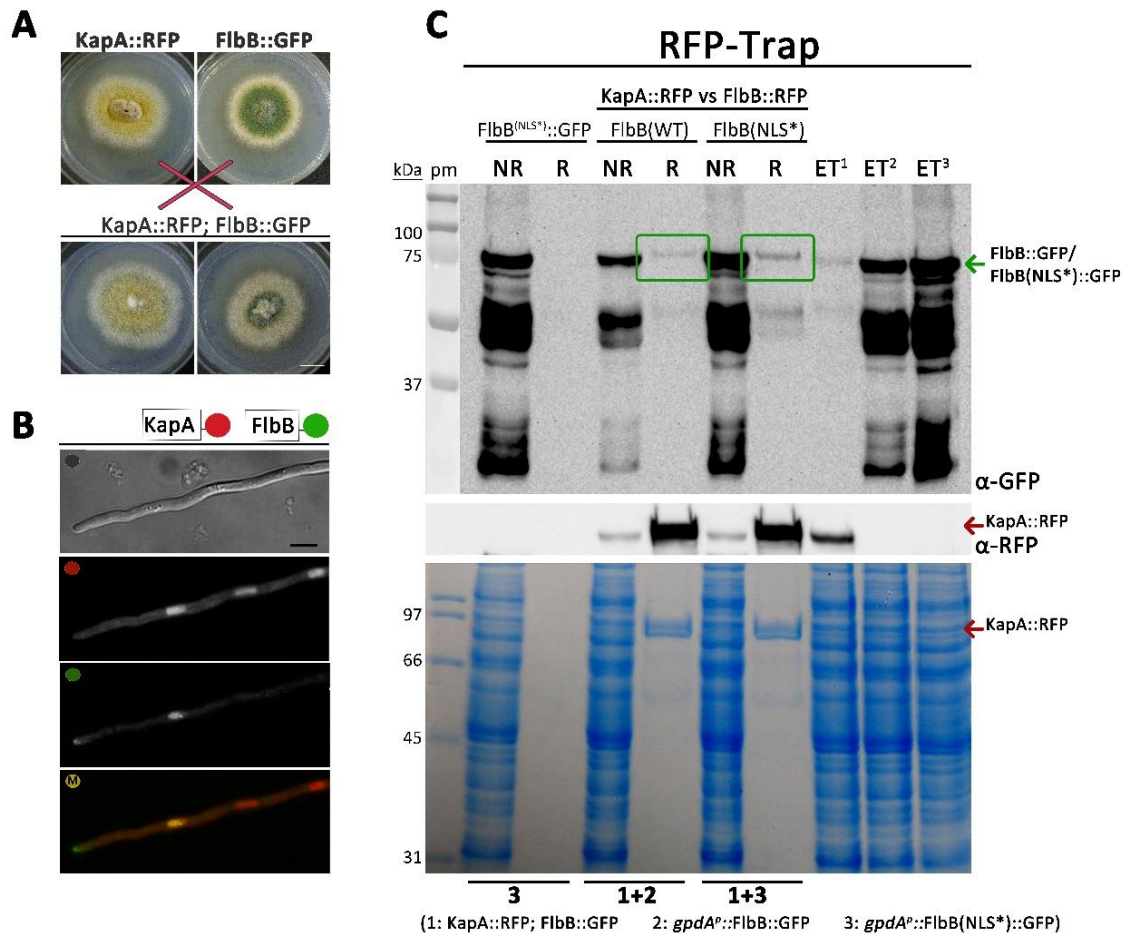
GFP-Trap® zutabeaz ere esperimentu bera errepikatu zen. Honela GFP::FlbB amu bezala erabiliz, ea harekin batera KapA erortzen ote zen behatu zen. Kontutan hartu behar da KapA-k hainbat kargorekin interakziona dezakeela; eta ondorioz, FlbB-rekin interakzionatuko balu ere, KapA amu gisa erabiltzean gainerako interaktoreek FlbB-ren erretentzia oztopa lezakete. Ondorioz, beste kargoekin lotutako KapA::mRFP frakzioa ez litzateke GFP-Trap® erretxinean lotutako FlbB::GFP frakzioarekin erretenituko, seinalearen intentsitatea txikituz. Alderantzizko *pull-down* saiakera honetan ere, FlbB erretxinean aberastu zela ziurtatu zen *Coomassie*-az. Jarraian, immunodetektziorako mRFP-ren aurkako antigorputzak erabili ziren KapA::mRFP detektatu ahal izateko. Frakzio erretenituan, KapA-ri zegokion tamainan eta oso ahulki bada ere, banda bat begiztatu zen (ikus 4.1. eranskinean, hirugarren zutabeko *Western-blot* eta *Coomassie*-a).

R fraktzioetan detektatutako FlbB::GFP edo KapA::mRFP banden intentsitatea oso ahula izan arren, erretentzio entseguek FlbB eta KapA-ren artean interakzioa egon zitekeela iradokitzen zuten. Usteko interakzio hori FlbB-ren NLS eremuaren bitartez eman zitekeen aztertzeko, FlbB<sup>(NLS\*)</sup> mutanteaz proba berak errepikatu ziren. FlbB-ren NLS eremuko K67A eta R68A aminoazidoen aldaketek interakzioa kaltetzen bazuten, erretenitutako frakzioan seinalea txikiagotzea espero zitekeen, modu berean kontrol gisa ere balioko zukeena. Kasurako *gpdA<sup>P</sup>::FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP* plasmidoaren *n* kopia ( $n \geq 3$ ) genoman integraturik zituen BD635 anduiaren proteina erauzkina erabili zen, KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimerak aldi berean adierazten zituen BD1128 anduiaren erauzkinarekin batera. Bai RFP-Trap® bai eta GFP-Trap® zutabeak erabili ziren, berriz ere. Erretenitutako frakzio bietan banda bana hauteman zen (kasuan kasu zegokion proteinaren banda), 4.1. eranskinean 2. eta 4. zutabetako irudietan

ikusten den bezala, hurrenez hurren. Are gehiago, espero zenaren aurka, FlbB-ren forma basatiaz egindako probetan baina seinale indartsuagoa detektatu zen forma mutantearekin. Emaitzak horrela, bazirudien NLS eremuko K67A eta R68A mutazioek KapA eta FlbB arteko ustezko interakzioa kaltetu beharrean indartu egin zutela.

Alabaina, aurretik deskribatutakoak modu independentean burututako entseguak izan ziren, eta emaitzak konparatze aldera azken entsegu bateratu bat egitea hobetsi zen. RFP-Trap<sup>®</sup> erretxina baliatuz, FlbB-ren forma basatiaz nahiz NLS\* aldaera mutatuaz errepikatu ziren entseguak. Bestalde, kontrol negatiborako *gpdA<sup>p</sup>::flbB<sup>(NLS\*)</sup>::gfp* plasmido kopia ugari zeramatzan anduiaren proteina erauzkina erabili zen. Kontrol proba ontzat eman zen, frakzio erretenitua garbia ikusten baitzen bai *coomassie*-az tindatutako gelean baita mRFP-immunodetekzioan ere (4.3C irudia, lehen bi kaleak). Esperimentuen kasuan, frakzio erretenituetan, FlbB-ren bi aldaeren (basatia eta NLS\* mutantea) seinaleak detektatu ziren (4.3C irudia, 3-4 eta 5-6 kaleak, hurrenez hurren). Berriz ere, NLS\* mutanteak intentsitate handiagoko seinalea eman zuen. Itxura denez beraz, K67A eta R68A aminoazidoen ordezkatzeez ez lukete KapA eta FlbB arteko ustezko elkarrekintza kaltetuko, are gehiago indartu egingo lukete. Edonola ere, bi probatan positibo eman izanak, FlbB eta KapA elkar erretenitzeko gai direla erakusten du, bien arteko interakzio posible bat iradokiz. Aurrera begira, mutazioaren efektua argitze aldera, interesgarria litzateke *gpdA<sup>p</sup>* promotorepean FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP eta, bestetik, KapA::mRFP kimerak aldi berean adierazten dituen anduia sortzea. Izan ere, proba hauetan proteina erauzkinen nahastea erabili dugu eta ondorioz, nahiz eta kantitate txikian izan, erauzkin nahastean FlbB forma basatia ere aurkitzen zen. Bide batez, *gpdA<sup>p</sup>* promotorepean FlbB::GFP eta, bestetik, KapA::mRFP kimerak aldi berean adieraziko lituzkeen anduia sortzea ere aproposa litzateke, abiaburuko FlbB eta FlbB<sup>(NLS\*)</sup> kontzentrazioak berdintze aldera.

#### 4. KAPITULUA:



**4.3. irudia: KapA::mRFP eta FlbB::GFP-ren arteko ustezko harreman funtzional baten azterketa.** A) KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimerak bi aldiz berean adierazten dituzten anduien fenotipoa erakusten da, erreferentziazko *kapA::mrfp* eta *flbB::gfp* andui parentalenekin batera, inokulaziotik 72 ordura MMA-n 37 °C-tan inkubatu eta gero. Bi proteinak etiketatuta dauden anduietan konidiazioa kaltetuta ageri da. Eskala barra = 1 cm. B) KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimeren lokalizazio subzellularra biak aldiz berean adierazten dituen anduiaren hifatan. Bi proteinek lokalizazio nuklearra partekatzen dute (kolore horiz ikusten den bezala). Zaila da, baina, dinamika bateraturik bereizten punta eta gertueneko nukleoaren artean. Eskala barra = 5µm. C) RFP-Trap<sup>®</sup> erretxinaz *pull-down* entseguak KapA::mRFP (amua) eta FlbB::GFP kimeren artean. Lehen bi laginak, kontrol probaren frakzio erretenu gabeari (NR) eta erretenuari (R) dagozkie, hurrenez hurren. R frakzioa garbi ikusten da, prozesuan zehar garbiketarik ondo burutu direla ziurtatuz. Hurrengo bi laginak FlbB-ren forma basatiari dagozkio, R-n banda ahul bat ikus daitekeelarik FlbB-ren tamainan (lauki berdez adierazia). Ondorengo bi laginak FlbB<sup>(NLS\*)</sup> forma mutanteari dagozkio, bere R frakzioan ere banda bat ikus daitekeelarik (bigarren lauki berdea), aldaera basatiaz ikusten dena baina sendoagoa. Beraz, badirudi K67A eta R68A mutazioek FlbB/KapA ustezko interakzioa sendotu dezaketela. Bestalde, RFP antigorputzez egindako *western-blot*-ean nahiz *coomassie*-az tindatutako gelean, KapA::mRFP bi erretxinetan (R) pareko aberastu zela ikus daiteke. Azken hiru laginak erabilitako proteina erazkin totali dagozkie (ET): (1) KapA::mRFP; FlbB::GFP; (2) *gpdA<sup>P</sup>*::FlbB::GFP eta (3) *gpdA<sup>P</sup>*::FlbB<sup>(NLS\*)</sup>::GFP, anduiena hain zuzen.

2.1.2. *nudA1* mutazio termosentikorraren eraginpean FlbB-ren metaketa nuklearra inhibititu egiten da.

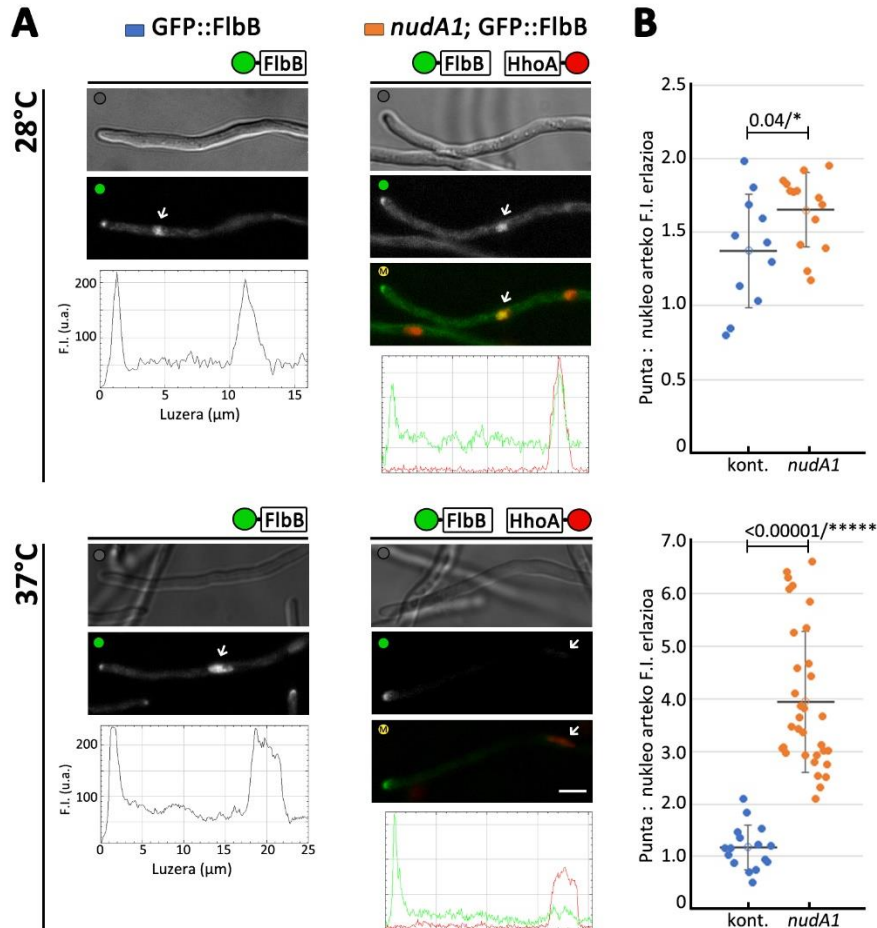
FlbB-ren garraio basipetala MT-etan zehar eman daitekeela deskribatu izan da. Izan ere, MT-en polimerizazioa kaltetzen duen benomilo konposatu kimikoaren aurrean,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB-k duen dinamika zitoplasmiko bidirekzionala kaltetu zela ikusi zen (Otamendi *et al.*, 2019). MT-etan zehar kargoen garraioan dihardute kinesinak eta dineina proteina motoreak (Egan *et al.*, 2012a). Lehenek, MT-en plus ertzteranzko garraioa ahalbidetzen dute, bigarrenak MT-en minus ertzteranzko garraioa burutzen duen bitartean (Egan *et al.*, 2012a). Norantza hauek, ia beti, hifen puntarekin (plus ertzak) eta nukleoaren aldearekin (minus ertzak) kointziditzen dute. Horrela, kinesinek puntaranzko garraioa kontrolatzen dute (akropetala), dineinak garraio basipetala burutzen duen bitartean. Orokorra den bezala, *A. nidulans*-en genomak dineina motore bakarra kodetzen du. Horregatik, dineinak FlbB-ren garraioan funtziorik izan zezakeen aztertu nahi izan zen kapitulu honetan. Horretarako, dineina konplexuaren osagai den NudA azpiunitate handia (Xiang *et al.*, 1994) oinarri hartuta, *nudA1* mutazio termosentikorra erabili zen tresna genetiko gisa fondo genetiko honetan FlbB-ren lokalizazioa aztertzeke.

Mutazio termosentikorra izaki, tenperaturaren baitan NudA funtzionala (28°C; tenperatura permisiboa) edo ez-funtzionala (37°C; errestriktiboa) izan zitekeen andui berean (Peñalva *et al.*, 2017). Anduiaren egokitasuna ziurtatzeko 28°C-tan egindako behaketetan, oraindik tenperatura permisiboa izanik, bai erreferentzia anduian (*nudA*<sup>+</sup>) baita mutatuan ere (*nudA1*) FlbB nukleoan ikus ahal izan zen (4.4A irudia, goian). Punta eta gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentsia erlazioa  $1.37 \pm 0.39$ -koa zen *nudA*<sup>+</sup> anduian eta  $1.65 \pm 0.25$  *nudA1* fondo genetikoan ( $p = 0.04$ ;  $n = 12$  eta 14 hifa, hurrenez hurren, andui bakoitzarentzat; 4.4B irudia, goian). Aldiz, tenperatura 37°C-tara igotzean, egoera errestriktibora igarotzeaz, FlbB nukleoetatik deslokalizatu zen (ikus 4.4A irudia, behean). Hifen punta eta gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentsia erlazioa  $1.18 \pm 0.42$ -tik (*nudA*<sup>+</sup>),  $3.95 \pm 1.34$ -ra igo zen *nudA1*

#### 4. KAPITULUA:

fondo genetikoan ( $p = 2.3 \cdot 10^{-10}$ ;  $n = 16$  eta 33 hifa andui bakoitzean, hurrenez hurren; 4.4B irudia, behean).

Dineinak hifatan nukleoek izango duten posizioa eta distribuzioa ere kontrolatzen ditu *A. nidulans*-en (Xiang *et al.*, 1995a; Xiang eta Fischer, 2004). Horrela, *nudA1* mutazioaren ondorioz nukleoaren distribuzioa bera ere kaltetuta aurki zitekeenez, eta ohiko nukleo-arteke distantziak alda zitezkeenez (ikus 4.4A irudian *nudA1* fondo genetikoan, 37°C-tan, fluoreszentsia grafikoetan nukleoak puntatik urrutiago agertzen direla), HhoA::mRFP nukleo markaitzailea erabili zen nukleoaren kokapena determinatzeko. Honek, andui honetan fluoreszentsia nuklearra fidagarritasunez neurtzeko aukera eman zuen. Emaitzak ikusita, badirudi NudA proteinaren inaktibazioak puntatik nukleorako FlbB-ren garraioa inhibitu zuena. Honek iradokitzen du dineina proteina motorea beharrezkoa dela FlbB-ren garraio basipetalean eta, ondorioz, honen metaketa nuklearrean. Dineinaren parte hartzea eta aurre lanetan deskribatutako MT-en beharra bat datoz aurkeztutako nukleoranzko garraio ereduarekin (ikus eztabaida orokorra).





**4.4. irudia: GFP::FlbB-ren lokalizazio subzelularra *nudA1* fondo genetikoan.** A) GFP::FlbB-ren lokalizazio subzelularra *nudA+* (ezkerra) eta *nudA1* (eskuina) fondo genetikoetan, 28°C-tan (temperatura permisiboa; goian) eta 37°C-tan (temperatura errestriktiboa; behean). *nudA1* fondo genetikoari dagokion irudietan nukleoaren posizioa HhoA::mRFP markatzailearen bitartez determinatu zen (geziez ere adierazten direnak). Bloke bakoitzaren azpiko grafikoan, puntatik gertueneko nukleorako distantzian zehar FlbB-ren fluoreszentsia intentsitatea (eta HhoA-rena hala dagokionean) irudikatzen da. Ikus daitekeenez, 37°C-tan eta *nudA1* fondo genetikoan, FlbB puntan detektatu zitekeen baina, nukleoan jada ez zen begiztatzen. Eskala barra = 5 µm. B) *Scatter-plot* grafikak, temperatura eta andui bakoitzean neurtutako punta eta gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentsia intentsitate erlazioak irudikatzen dituztenak. 37°C-tan erreferentziako *nudA+* anduiaren  $1.18 \pm 0.42$  balioa erdietsi zen, eta *nudA1* fondoan berriz  $3.95 \pm 1.34$ -ra igo zen ( $p = 2.3 \cdot 10^{-10}$ ;  $n = 16$  eta 33, hurrenez hurren).

## 2.2 FlbD-ren parte-hartzea FlbB-ren metaketa nuklearrean.

FlbB TF gisa nukleoetara iritsi eta bertan FlbD-rekin batera, cMyb TF-a hau, *brlA*-ren promotorera lotzen da *brlA*-ren transkripzioa erregulatuz. Alabaina,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB ez da *brlA*-ren promotorera lotzen (Garzia *et al.*, 2010). Are gehiago, FlbD-ren gabezia FlbB ez da nukleoetan lokalizatzen eta zitoplasman mugitzen geratzen da (Otamendi *et al.*, 2019). Aldiz, *alc<sup>p</sup>* promotorepean eragindako *flbD*-ren gain-adierazpenak FlbB-ren metatze nuklearra areagotu zezakeela ikusi zuen Elixabet Oiartzabal-Arano doktoreak (Otamendi *et al.*, 2019). Atal honetan, FlbD-k FlbB-ren metaketa nuklearrean izan zezakeen rola nahiz *brlA*-ren erregulazioan bi TF-k izan zezaketen elkarlana aztertzen jarraitu nahi izan zen.

### 2.2.1. FlbD-ren cMyb eremua eta C-terminal ertza ezinbesteko dira FlbB-ren metaketa nuklearrerako.

FlbD-ren azterketarako aurrez laborategian sortu ziren FlbD::GFP eta FlbD::HA<sub>3x</sub> anduien fenotipoaren azterketa sakonago batean, ordura arte deskribatu ez ziren zenbait ezaugarri behatu zen. Izan ere, FlbD::HA<sub>3x</sub> anduiak konidiazioa atzeratua aurkeztu zuen andui basatiarekiko. Bazirudien, beraz, C-terminaleko etiketatzeak FlbD-ren funtzionalitatea kalte zezakeela (4.5A irudia). Alabaina, GFP epitopoa HA<sub>3x</sub> baina handiagoa izaki (9 aldiz aminoazido gehiago ditu), ez zen konidiazio arazorik antzeman FlbD::GFP anduiak. Inokulaziotik 48 ordura,

#### 4. KAPITULUA:

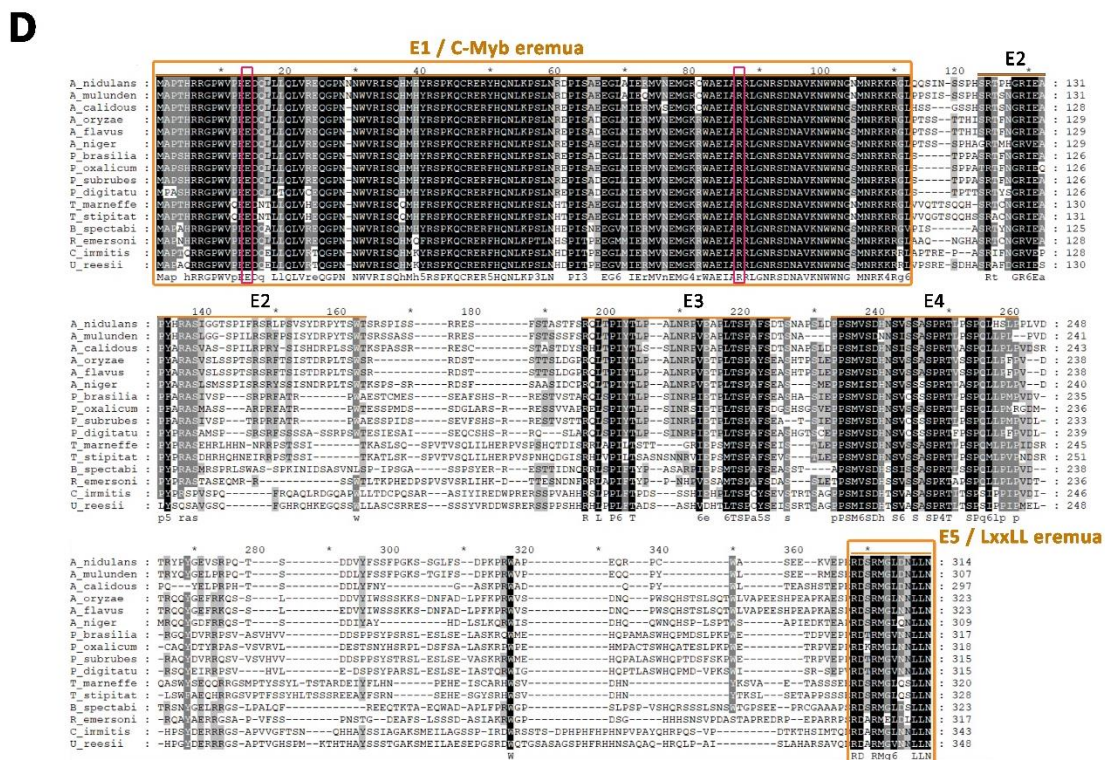
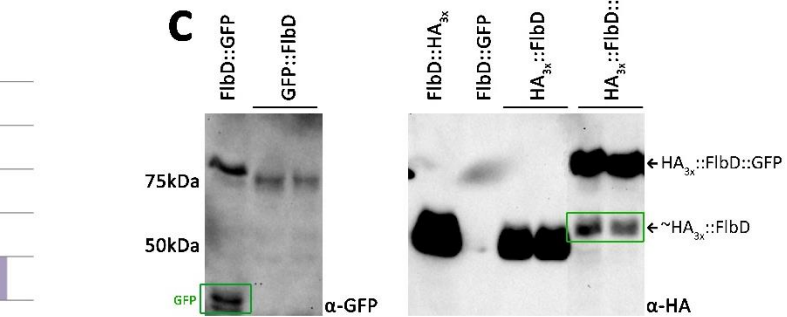
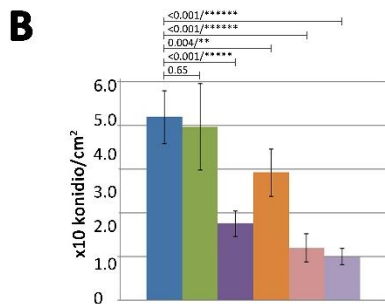
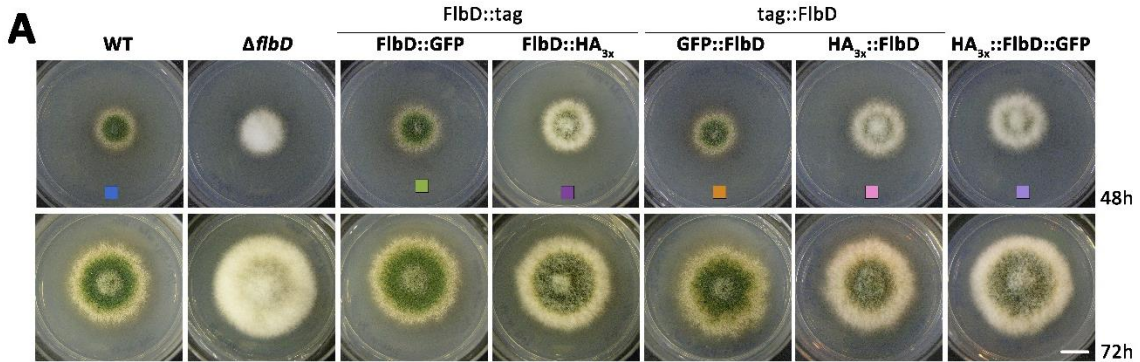
---

erreferentzia andui basatiak batzbesteko  $4.3 \cdot 10^7 \pm 0.8 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> ekoizten zuen bitartean, *flbD::ha<sub>3x</sub>* anduiak  $1.9 \cdot 10^7 \pm 0.3 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> kuantifikatu ziren ( $p = 0.0000051$ ). Aldiz, *flbD::gfp* andui erreferentziazkoaz alderatzean,  $p$  balioa 0.65 izaki, aldaketa ez zen estatistikoki adierazgarria ( $n = 6$  erreplika andui bakoitzeko) (4.5B irudia).

C-terminal ertzaren manipulazioak FlbD-ren aktibitatean izan zezakeen ustezko eragina sakonago aztertu nahian, N-terminala etiketatzea erabaki zen, GFP::FlbD, HA<sub>3x</sub>::FlbD eta HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP kimerak adieraziko zituzten anduiak sortuz. C-terminalaz bezala, HA<sub>3x</sub> epitopoaz (HA<sub>3x</sub>::FlbD) konidiazioaren atzeratze argi bat neurtu zen, *gfp::flbD* anduietan hain nabarmen ez zena (erreferentzia anduiarekiko alderatuz  $p = 0.004$ ,  $p = 0.00000090$  eta  $p = 0.00000024$  balioak erdietsi ziren GFP::FlbD, HA<sub>3x</sub>::FlbD eta HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP kimera adierazten duten anduei;  $n = 6$  erreplika andui bakoitzeko) (4.5A eta B irudiak). Emaitza hauek, ondoren azalduko den azterketa bioinformatikoan ikusitako FlbD-ren N-terminal nahiz C-terminal ertzen kontserbazioarekin batera, bi eremu horiek garrantzitsuak izan zitezkeela iradokitzen zuten. Aldiz, ez zuten azaltzen zergatik HA<sub>3x</sub>-rekin egindako etiketatzeak, baina ez GFP-rekin egindakoak (epitopo handiagoa izanik gainera), konidiazioa partzialki inhibitzen zuen.

Azken galdera honi erantzun nahian, GFP-ren ustezko mozketak bat gerta zitezkeela proposatu zen. Aukera hori aztertzearen, HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP kimera adierazten zuen anduiaren proteina erauzkinaren immunodetekzioa burutu zen, 4.5C irudian erakusten dena. Jatorrizko HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP proteinari zegokion tamaina lekuan banda bat antzeman bazen ere, bigarren banda bat ere detektatu zen, hain justu HA<sub>3x</sub>::FlbD bandari legokiokeen tamaina baino apur bat handiagoa zena (GFP etiketaren N-terminaleko aminoazido batzuk mantendu baitzitezkeen). Beraz, HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP kimeran GFP etiketaren mozketak jazotzen zela ondorioztatu zen. Honek azal lezake, neurri batean, fluoreszentsia mikroskopian FlbD::GFP-ren fluoreszentsia intentsitate baxuak (Garzia *et al.*, 2010).

FlbB-ren garraio basipetala eta metaketa nuklearra *brlA*-ren transkripzioa erregulatu ahal izateko



## 4. KAPITULUA:

---

### 4.5. irudia: FlbD-ren N- eta C- terminal ertzen etiketatzea eta proteinaren kontserbazioa ortologoetan.

A) Erreferentziazko andui basatia eta  $\Delta flbD$  mutante nuluarekin konparatuta, FlbD-ren C-terminal edo N-terminal ertza etiketatua duten anduien (FlbD::GFP; FlbD::HA<sub>3x</sub>; GFP::FlbD; HA<sub>3x</sub>::FlbD eta HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP) fenotipoa, 37°C-tan, inokulaziotik 48 (goiko lerroa) eta 72 ordura (beheko lerroa). HA<sub>3x</sub> epitopoz etiketatzean onddoaren konidiazioa atzeratu egin zela ikusi zen; aldiz, GFP epitopoarekin, handiagoa izanik ere, ez dirudi konidiazioan inhibizio esanguratsurik eragin zenik. B) Esporen kuantifikazio grafikoa (konidio/cm<sup>2</sup>), inokulaziotik 48 ordura. Erreferentziazko andui basatiarekiko alderatuz, *flbD::gfp* ez beste andui guztietan, konidio kopurua modu adierazgarrian jaitsi zen ( $p < 0.05$ ). C) Etiketaturako FlbD adierazten duten anduien proteina erauzkintan GFP eta HA<sub>3x</sub> detektatzeko *Western-blot*-ak. Ezkerraldean ( $\alpha$ -GFP antigorputzaz), FlbD::GFP laginaz kimeraren osoaren bandaz batera GFP-ren tamainaz bigarren degradazio banda bat ikus daiteke (lauki berdez adierazia). Aztertutako lagin guztietan, detektaturako banden intentsitate baxua ondorioztatu daiteke. Eskuinaldean ( $\alpha$ -HA<sub>3x</sub> antigorputzaz), FlbD::HA<sub>3x</sub> eta HA<sub>3x</sub>::FlbD kimeren adierazpena baieztatu zen, esperotako tamainan bandak detektatuz. Bestalde, HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP laginaz kimeraren osoari zegokion tamainan banda nagusi bat ikusteaz gain bigarren banda bat agertu zen. Bigarren hori HA<sub>3x</sub>::FlbD kimerari zegokiokeena baina apur bat gorago aurkitzen zen (lauki berdez adierazia). Baliteke, beraz, HA<sub>3x</sub>::FlbD fragmentuaz batera GFP epitopoaren aminoazido batzuk eraman izana baina, emaitza honek GFP-ren degradazioa iradokitzen zuen. D) FlbD-ren hainbat ortologoaren lerrokatzea GeneDoc programaz. Ortologoak identifikatu ziren Eurotiales eta Onygenales ordenetako, eta Sordariomizetoen klaseko espezetan. Bateko zein besteko, kontserbatutako bost eremu (E1, E2, E3, E4 eta E5) identifikatu ziren (lerro laranja adieraziak). Irudian E1 eta E5 eremuak kolore laranja inguratu dira, aurreko paneletan erakutsitako emaitzen arabera, FlbD-k bere funtzioa bete dezan ezinbestekoak direlako. Bestalde, E14 eta R87 aminoazidoak adierazi dira arrosa koloreko laukietan, 2.2.1B atalean erakutsitakoaren arabera, isolaturako mutante akonidialean identifikatu ziren aminoazido mutatuak (E14G;R87Q) baitira bi horiek. Biak oso kontserbatuta daude FlbD-ren ortologoaren artean.

### 2.2.1A. FlbD-ren cMyb eremua nahiz C-terminaleko azken aminoazidoak oso kontserbatuta daude FlbD-ren ortologoetan.

Etiketatzearen ondorioak ikusirik, FlbD-ren azterketa bioinformatikoa egitea erabaki zen. A. *nidulans* onddoaren FlbD proteina sekuentzia bilaketa termino bezala erabiliz, BLAST-a burutu zen. Algoritmoak ortologoak identifikatu zituen Eurotiales eta Onygenales ordenetako, eta Sordariomizetoen klaseko hainbat espezetan (azterketa hau Luis Pablo Gonzalo GrAL ikasleak egindako lanean oinarritua dago). Ortologo horien lerrokatzean (Genedoc programaz burututako irudia; 4.5D, goian) bost eremu kontserbatzen zirela ikusi zen. Horietatik baina, ertzetako bi eremuak kontserbatzen ziren nagusiki aipaturako hiru orden eta klase fungikoetan (4.5D irudia, behealdean), eta aztergai hartu ziren.

N-terminal ertzean cMyb eremua aurkitzen da, familia honetako TF-ak bereizgarritzen dituen DNA-ra lotzeko eremua, hain zuzen. Myb domeinua 50 aminoazido inguruz osatzen da eta errepikapen ugari izan ditzake (Arratia eta Aguirre, 2013). Hala, *A. nidulans*-en FlbD-n bi errepikapen aurkitzen direla deskribatu izan da, hain zuzen, N-terminalean ia guztiz kontserbatzen diren 115-120 aminoazidoen luzerarekin bat letozkeenak. Eremu hau FlbD-ren sekuentzia kontserbatuena izan zen, seguruenik DNA-ri lotzeko eremu funtzional gisa diharduelako.

Ortologoen alineamenduan, C-terminal ertzean, azken 10-15 aminoazidoko sekuentzia laburra ere nabarmen kontserbatzen zela begiztatu zen. Bestalde, *Eukaryotic linear motif* (ELM; <http://elm.eu.org/>) web zerbitzariak, proteina sekuentzia batean funtzio bat izan lezaketen motiboak iragartzen dituen tresna bioinformatikoak, FlbD-ren C-terminaleko azken aminoazidoek LIG\_NRBOX motibo bat osa zezaketela proposatu zuen (LxxLL; 308-314 aminoazidoak; e balioa:  $2.63e^{-04}$ ). LIG\_NRBOX motiboak errezeptore nuklearrei lotzeko aukera ematen omen du eta ko-aktibatzaile transkripzionaletan aurkitzen dela deskribatu da ([http://elm.eu.org/elms/LIG\\_NRBOX.html](http://elm.eu.org/elms/LIG_NRBOX.html)). FlbD TF bat izaki eta nukleotan aurkitzen delarik (Garzia *et al.*, 2010), pentsa zitekeen eremu hori nukleotan pilatzeko edota FlbB beraren lokalizazio nuklearrerako beharrezkoa dela.

Azterketa bioinformatikoen FlbD-ren bi ertzen kontserbazio altua azpimarratzen dute, eta hau bat dator bere forma etiketatuak adierazten dituzten anduien ezaugarritzean deskribatutako garrantzia biologikoarekin.

#### 4. KAPITULUA:

---

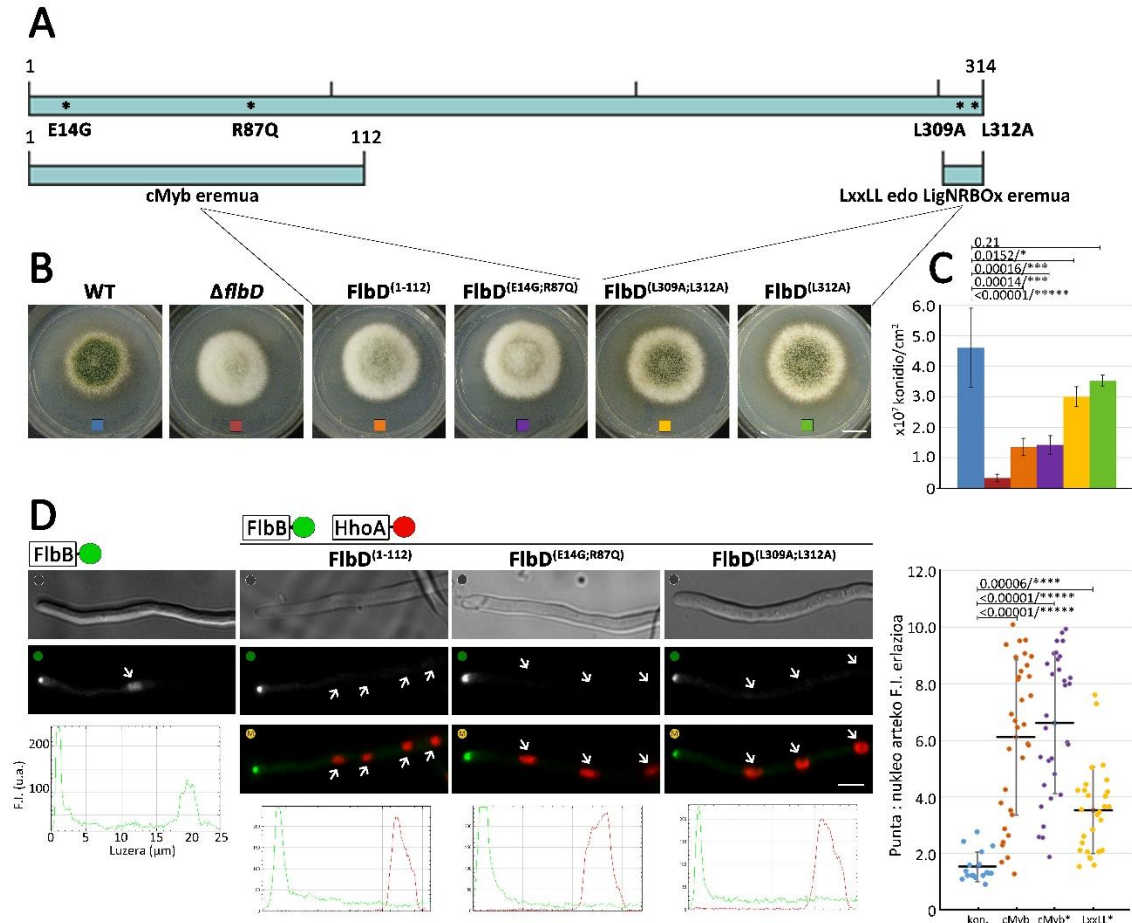
2.2.1B. FlbD-ren cMyb eremua ezinbesteko da FlbB nukleoetan pilatuko bada, baina ez da nahikoa.

cMyb eremuaren kontserbazio altuak eremu honen garrantzia begi-bistarazten du. Aitor Garzia doktoreak eta kideek eremu hau DNA-ra lotzeko gai zela ikusi zuten, eta zehazkiago *brlA*-ren promotorera lotzen zela erdietsi zuten (Garzia *et al.*, 2010). FlbD-ren cMyb eremuaren funtzioa sakonago aztertu nahirik, eremu hori soilik (FlbD<sup>(1-112)</sup>) adieraziko zuen anduia eraiki zen. Bestalde, *flbD*-ren ausazko mutagenesiaz eremu hau mutatua zuen FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> kimera adierazten zuen mutante akonidial bat isolatu zen (4.5D eta 4.6A irudian adierazten da mutazioen lokalizazioa). E14 eta R87 bi aminoazido horien mutazioak nola eragin dezakeen kapitulu honetako eztabaidan aztertuko da. Bi anduiek, fenotipo aldetik, konidiazioaren inhibizio esanguratsua erakutsi zuten. Inokulaziotik 72 ordura, erreferentzia andui basatiaz alderatuz, FlbD<sup>(1-112)</sup> kimera adierazten zuen anduiak  $p = 0.00014$  eta FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> kimeradunak  $p = 0.00016$  balioak eman zituzten ( $p < 0.05$  bi kasuetan;  $n = 6$  erreplika andui bakoitzeko) (4.6B eta C irudiak).

$\Delta flbD$  fondo genetikoan, hifen nukleoetan FlbB-ren galera jazotzen den bezala, FlbD-ren mutazio hauek FlbB-ren lokalizazio subzelularrean izan zezaketen eragina aztertzearen, fondo mutante horietan FlbB::GFP kimera adieraziko zuten anduiak sortu ziren transformazioz. Bai FlbD<sup>(1-112)</sup> bai FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> anduiek FlbB-ren lokalizazio nuklearraren apaltzea hauteman zen (4.6D irudia). Punta eta gertueneko nukleoaren fluoreszentzia intentsitateen arteko erlazioa nabarmenki handitu zen erreferentzia anduiarekin alderatuz; *flbD* aldaera basatia zuen fondo genetikoan  $1.53 \pm 0.53$  ( $n = 17$  hifa) bazen fluoreszentzia erlazioa, hau  $6.11 \pm 2.75$  eta  $6.60 \pm 2.48$ -ra igo zen FlbD-ren bi andui mutanteetan, hurrenez hurren ( $p = 0.000000016$  eta  $p = 0.0000000012$ ;  $n = 33$  eta  $n = 31$  hifa, hurrenez hurren). 4.6D irudian ikus daitekeen bezala HhoA::mCherry kimera erabili zen nukleoaren posizioaren markatzaile bezala. Honek, bertako fluoreszentzia berdea (FlbB-ri zegokiona) neurtzeko aukera eman zuen. Emaitzek, FlbB nukleoan metatzeko FlbD-ren cMyb eremua ezinbestekoa dela iradokitzen zuten. Alabaina, cMyb eremua

## FlbB-ren garraio basipetala eta metaketa nuklearra *brlA*-ren transkripzioa erregulatu ahal izateko

soilik adierazten duen anduiaz ikusi bezala, eremu hau bere horretan bakarrik ez da nahikoa FlbB nukleoan metatzeko. FlbD-ren etiketatzeak dituen inplikazioak direla eta (ikus 2.2.1 atala), aztertzeke dago ezaugarritutako FlbD-ren mutazio hauek bere lokalizazioan duten eragina (ikus eztabaida atala).



**4.6. irudia: FlbD-ren cMyb eta C-terminaleko LxxLL eremuen azterketa.** A) FlbD proteina sekuentzian cMyb DNA-ra lotzeko eremua (1-112) eta LxxLL (ustezko LIG\_NRBOX errezepzio nuklearreko) eremuak adierazten dira. Eremu horietako (E14G;R87Q) eta (L309A;L312A) mutazio puntualak ere kokatzen dira. B) Andui basatia (WT),  $\Delta flbD$ , eta FlbD<sup>(1-112)</sup>, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup>, FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> edo FlbD<sup>(L312A)</sup> kimerak adierazten dituzten anduien fenotipoa medio solidoan, 37°C-tan 72 orduz hazi ondoren. Andui mutanteek andui basatiak baino konidio ekoizpen txikiagoa aurkeztu zuten. Eskala barra = 1cm. C) Esporen kuantifikazio grafikoa (konidio/cm<sup>2</sup>). Erreferentziazko andui basatiaren aldean FlbD<sup>(1-112)</sup>, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> edo FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> kimerak adierazten duten anduiek ( $p < 0.05$ ) konidio jaitziera esanguratsua aurkeztu zuten. D) FlbB::GFP-ren kokapen subzellularra WT, FlbD<sup>(1-112)</sup>, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> eta FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> anduien hifatan. Erreferentziazko anduiarekin alderatuta, andui mutanteetan FlbB-ren fluoreszentsia nuklearra jaitzi egin zen. H1 histona (HhoA::mCherry) nukleo markatzaile gisa erabili zen (geziez adierazi dira nukleoak). Eskuinaldeko *scatter-plot* grafikoa andui bakoitzeko neurtu ziren punta eta puntatik gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentsia intentsitate erlazioak irudikatu dira (erreferentzia urdinez, FlbD<sup>(1-112)</sup> laranja, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> morez eta FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> horiz). Kasu guztietan fluoreszentsia erlazio aldaketa adierazgarria eman zen. Eskala barra = 5 μm.

#### 4. KAPITULUA:

---

2.2.1C. FlbD-ren C-terminal ertzean aurkitzen den LxxLL eremuko Leu309 eta Leu312 aminoazidoak beharrezkoak dira FlbB nukleoetan meta dadin.

Azterketa bioinformatikoen FlbD-ren C-terminal ertzaren garrantzia iradokitzen zuten eta LIG\_NRBOX eremu bat izan zitekeela proposatzen zuten. Bada, zuzenduriko mutagenesi prozeduraz C-terminal ertzaren LxxLL eremua mutatzearabaki zen, 309 eta 312 posizioetan kokatutako leuzinak alaninekin ordezkatzuz (4.6A irudia). Izan ere, FlbD-ren ortologoen artean leuzina horiek oso kontserbatuta agertzen ziren (4.5D irudia). FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> andui mutatuan konidiazioaren galera esanguratsua deskribatu zen. Erreferentzia andui basatiaz  $4.6 \cdot 10^7 \pm 1.3 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> neurtu ziren artean, mutanteaz  $3.0 \cdot 10^7 \pm 0.3 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> bildu ziren ( $p = 0.0152$ ;  $n = 6$  erreplika andui bakoitzeko) (4.6B eta C irudiak). Bestalde, transformazio prozeduran isolatu zen FlbD<sup>(L312A)</sup> mutanteak, leuzina aldaketa bakarreko mutanteak, konidiazioa kaltetua bazuen ere, erreferentziarekiko  $p = 0.21$  balioa eman zuen ( $n=3$  erreplika andui mutanteaz). Honek, leuzina mutante bikoitzean konidiazioan deskribatutako efektua gehigarria izan zitekeela iradoki zuen.

cMyb eremuaz egin bezala, FlbB-ren lokalizazio subzelularra aztertu zen FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> mutantean. Fluoreszentzia intentsitatea nukleoetan jaitsi egin zen, eta ondorioz hifen puntaren eta gertueneko nukleoaren arteko fluoreszentzia erlazioak gora egin zuen. Erreferentzia anduiaz  $1.53 \pm 0.53$ -ko erlazioa neurtu zen, mutantean  $3.53 \pm 1.54$  erlazioa erdietsi zen bitartean;  $p = 0.000065$ ;  $n = 17$  eta  $28$ , hurrenez hurren) (4.6D irudia). Beraz, badirudi FlbD-ren C-terminal ertzean 309 eta 312. posizioetan kokatzen diren leuzinak beharrezkoak direla FlbB-ren metaketa nuklearrean eta, ondorioz, konidiazioaren aktibazioan.

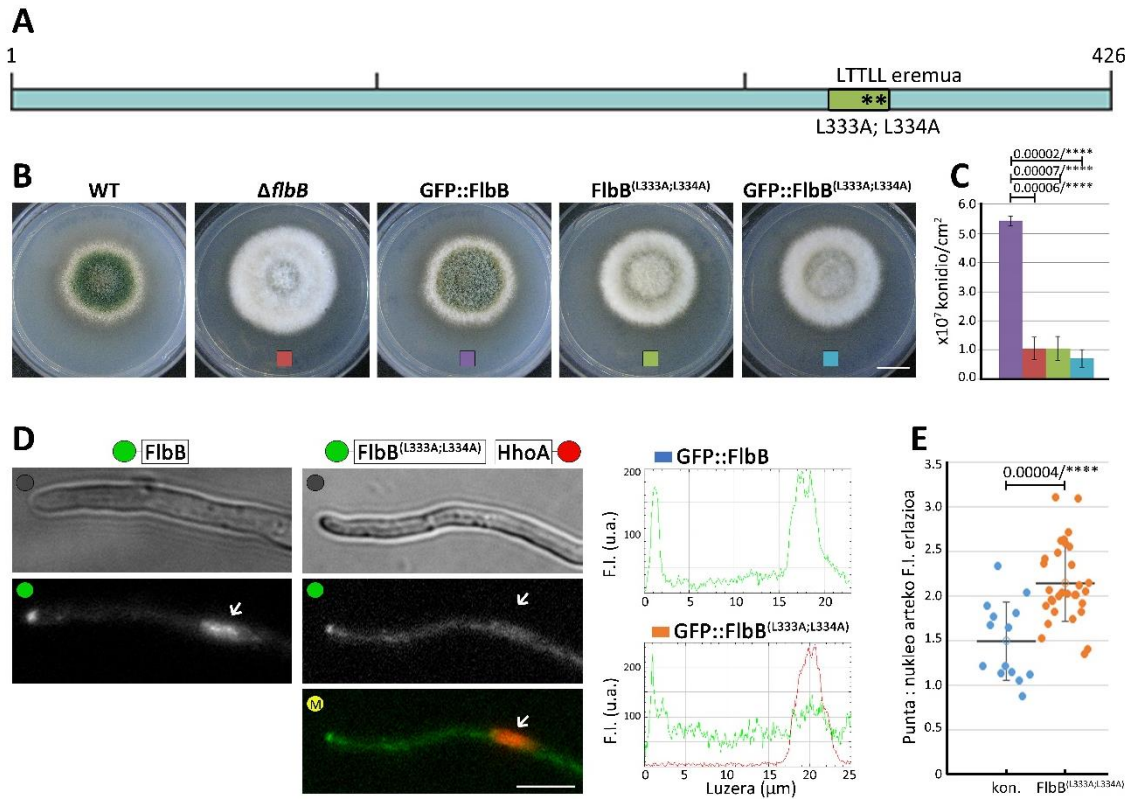


2.2.2. FlbB-ren C-terminal ertzeko Leu330 eta Leu334 aminoazidoak ezinbestekoak dira bere lokalizazio nuklearrerako.

LxxLL motiboa hain laburra izanda, bere presentzia FlbD-n edo beste edozein proteinatan ausazkoa izan zitekeen. Hori kontutan izanda, Marc S. Cortese ikertzaileak LxxLL motiboa zuten *A. nidulans*-en proteina guztiak identifikatu zituen (2227 proteina; ez erakutsia), eta ikusi zuen sekuentzia hori TF-etan aberastua dagoen motibo bat dela, proteinen beste familiekin konparatuta. Beraz, bioinformatikak LxxLL motiboaren funtzionaltasun hipotetiko bat babesten zuen. Hain justu, FlbB-ren baitan ere agertzen da LxxLL eremu hau (L330-L334); ez ordea *brlA*-ren promotorera lotzen diren beste TF-tan (FlbC, VosA, NsdD edo AbaA).

FlbD-rekin egin bezala, FlbB-ren 333 eta 334. posizioetako leuzinak ordezkatu ziren alaninekin (4.7A irudia). FlbB<sup>(L333A,L334A)</sup> kimera adierazten zuen anduiak konidio ekoizpen galera adierazgarria aurkeztu zuen. GFP::*FlbB* erreferentzia anduian  $5.43 \cdot 10^7 \pm 0.2 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup> neurtu baziren, mutanteaz  $0.71 \cdot 10^7 \pm 0.3 \cdot 10^7$  konidio/cm<sup>2</sup>-ra jaitsi zen konidio kopurua ( $p = 0.0000192$ ,  $n = 3$  erreplika anduiko) (4.7B eta C irudiak). Konidiazio galera hau bat letorke fluoreszentsia mikroskopian ikusitako GFP::*FlbB*<sup>(L333A,L334A)</sup> kimeraren metaketa nuklearraren jaitsierarekin (4.7D irudia). Hifen puntan eta gertueneko nukleoan FlbB-ren fluoreszentsia intentsitateen arteko erlazioa erreferentzia anduian  $1.49 \pm 0.44$  izan zen,  $2.14 \pm 0.44$  baliora igoz GFP::*FlbB*<sup>(L333A,L334A)</sup> kimera mutantea adierazten zuen anduian ( $p = 0.000036$ ;  $n = 14$  eta 31 hifa, hurrenez hurren) (4.7E irudia). Beraz, badirudi FlbD eta FlbB-ren LxxLL eremu hauek garrantzitsuak direla FlbB-ren metaketa nuklearrerako.

#### 4. KAPITULUA:

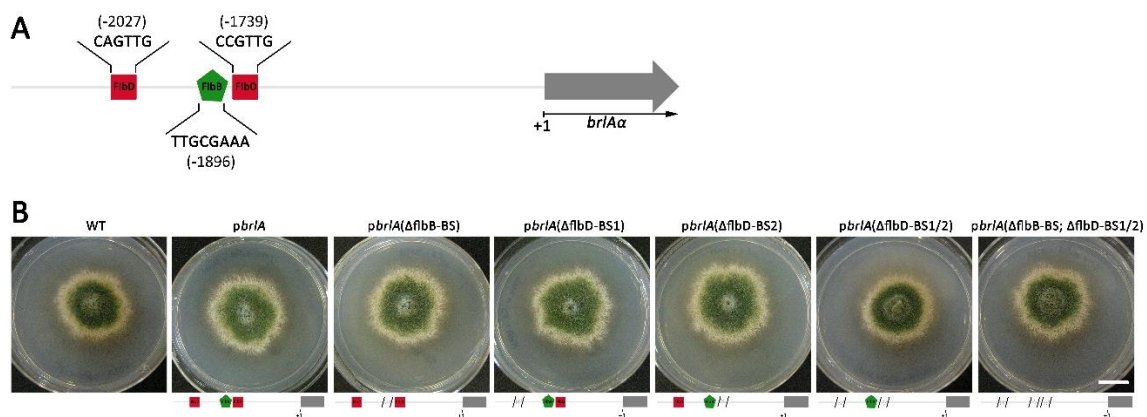


**4.7. irudia: FlbB-ren LxxLL eremuaren azterketa.** A) FlbB proteina sekuentziaren analisia. A. *nidulans*-en TF-tan aberastua dagoen motibo hau FlbB-ren baitan ere aurkitzen da. Beronen azterketarako L333 eta L334 aminoazidoak mutatu ziren alaninen ordeaz. B) Erreferentziako andui basatiaz eta  $\Delta flbB$  anduiak batera GFP::FlbB, FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> eta GFP::FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> kimerak adierazten dituzten anduien fenotipoak medio solidoan. L333A; L334A mutanteetan konidio ekoizpena nabarmen murriztu zen, *flbB* nuloaren pareko fenotipoa aurkeztuz. Anduiak 37°C-tan hazi ziren 72 orduz. Eskala barra = 1 cm. C) Esporen kuantifikazio grafikoa (konidio/cm<sup>2</sup>).  $\Delta flbB$ , FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> eta GFP::FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> anduietan neurtutako konidia produkzioaren beherakada estatistikoki adierazgarria zen, GFP::FlbB erreferentzia anduiarekiko. D) GFP::FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> kimeraren lokalizazio subzelularra. Leuzina mutanteak lokalizazio nuklearra inhibitua zuen, histona markatzaileak nukleoaren posizioa determinatzen zuen lekuan ez baitzen GFP::FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup> fluoreszentzia nabarmenik detektatzen. Hain zuzen, fluoreszentzia grafikoa ez da GFP::FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup>-ren pikorik begiztatzen HhoA::mRFP pikoaren parean. Eskala barra = 5  $\mu$ m. E) Andui bakoitzaren hifa desberdinetan neurtutako punta eta gertueneko nukleoaren fluoreszentzien arteko erlazioak erakusten dituen *scatter-plot* grafikoa. Puntu urdinak kontrol anduiari dagozkio (GFP::FlbB), eta laranja L333A; L334A forma mutantea adierazten duen anduiari. Bi anduien fluoreszentzia erlazio desberdintasuna adierazgarria zen.

2.3 FlbB eta FlbD-k *brlA*-ren promotorean lotzeko proposatu izan diren ustezko dianen delezioak ez du konidiazioa inhibitzen.

Bai FlbB bai FlbD *brlA*-ren promotoreko 300 nukleotido inguruko fragmentu batean lotzen dira, EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) eta ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) entseguetan ikusitakoaren arabera (Garzia *et al.*, 2010). Lan berean, bi TF-ek lotuko lituzketen ustezko eremuak proposatu ziren arren, Proteina-DNA lotura horiek ez ziren baieztatu. FlbB edo FlbD-rentzat ustezko lotze-dianak horiek izan zitezkeen ala ez aztertzearen, eremu horiek ezabatu ziren *brlA*-ren promotoretik.

FlbB-ren kasuan aurrez iragarritako ustezko diana sekuentzia TTGCGAAA zen eta -1896 posizioan aurkitzen zen (*brlA $\alpha$* -ren transkripzio hasiera hartu zen +1 posizio bezala) (Garzia *et al.*, 2010). Eremu hau delezionatua zuen anduia *brlA<sup>P</sup>- $\Delta$ flbB*-BS moduan izendatu zen. FlbD-ri, bestalde, bi diana posible proposatu zitzaizkion, CAGTTG (-2027) eta CCGTTG (-1739). Ustezko diana bakoitzaren delezioaz gainera (*brlA<sup>P</sup>- $\Delta$ flbD*-BS<sup>1</sup> eta *brlA<sup>P</sup>- $\Delta$ flbD*-BS<sup>2</sup>, hurrenez hurren), biak batera ezabatuta zituen anduia ere sortu zen. Aipatutako hiru eremu horiek 4.8A irudian irudikatzen dira.



**4.8. irudia: FlbB eta FlbD *brlA*-ren promotorera lotzeko ustezko lotze-eremuen delezio anduiak.** A) Ustezko eremuen kokapena *brlA<sup>P</sup>*-n. FlbB TF-a -1896 posizioan (+1 posizioa *brlA $\alpha$*  transkritoaren hasiera izaki) kokatzen den TTGCGAAA eremura lotu litekeela proposatu izan da (Garzia *et al.*, 2010), irudian pentagono berdeaz irudikatua. FlbD-ren kasuan bi lotze-eremu proposatu izan dira, CAGTTG (-2027) eta CCGTTG (-1739), karratu gorriez azaltzen dira irudian. B) Ustezko lotze-eremuak delezionatuta dituzten mutanteen fenotipoak. Bai FlbB eta FlbD lotzeko eremuen nulo sinpleak fenotipo konidiantea aurkeztu zuten, bai eta FlbD-rentzat ustezko bi eremuak batera ezabatu zirenean ere. *brlA<sup>P</sup>*-ren nulo hirukoitzak ere ez zuen konidiatzeko arazorik aurkeztu erreferentziako andui basatiarekiko. Ondorioz, ez dirudi eremu hauek *brlA*-ren erregulaziorako eta konidiaziorako ezinbestekoak direnik. Anduiak 37°C-tan hazi ziren 72 orduz MMA solidoan. Eskala barra = 1cm.

#### 4. KAPITULUA:

---

Hasiera batean, lotze-eremuak horiek balira, hauek kentzean pentsa liteke FlbB-k edo/eta FlbD-k ezingo zuketela *brlA<sup>p</sup>*-ra lotu eta, beraz, *brlA*-ren adierazpena induzitu ezean konidiazioa inhibituko litzatekeela. Nulo sinpleen kasuan ez zen konidiazioaren galerarik antzeman (4.8B irudian 3-5 argazkiak), ezta *brlA<sup>p</sup>-ΔflbD-BS<sup>1-2</sup>* FlbD-ren ustezko bi dianak batera delezionatuak zituen anduiaren ere (4.8B, 6. irudia). Hori ikusirik bi TF-rentzat iragarri ziren ustezko lotze diana guztiak *brlA<sup>p</sup>*-tik batera ezabatzea erabaki zen. Sortutako anduiak ere ez zuen, konidiazioari zegokionez, erreferentziazko andui basatiaz fenotipo aldaketarik aurkeztu (4.8B, 7. irudia). Beraz, ezin genezake esan ezabatutako eremuak FlbB eta FlbD *brlA<sup>p</sup>*-ra lotzeko eremu direnik, edo ez behintzat *brlA*-ren erregulaziorako ezinbestekoak direnik. Alabaina, gerta liteke eremu horien galerak FlbB eta FlbD-ren kokapenaren berrantolaketa bat eragitea eta *brlA<sup>p</sup>*-ren beste eremu batera lotu izana. Edonola ere, proteina-DNA lotura entsegu gehiago (EMSA eta/edo CHIP) behar dira *brlA*-ren indukzioari bide ematen dion FlbB eta FlbD arteko koordinazio mekanismoa ezagutzeko.

### 3. Eztabaida.

Kapitulu honetan burututako esperimenduak FlbB-ren garraio basipetala eta metatze nuklearra nola gauzatzen diren ulertze aldera bideratuta egon dira. FlbB-ren moduan distantzia luzeko komunikazio lanetan diharduten TF-en adibideak aurki daitezke neuronetan, non lesioen aurrean erregenerazio erantzun bat aktibatzea duten xede (Panayotis *et al.*, 2015). Hain zuzen, neuronetan inportinek joka dezaketen garraio funtzioa eta honen garrantzia ere deskribatu izan da (Otis *et al.*, 2006; Perry eta Fainzilber, 2009). FlbB-ren baitan aurkitzen den ustezko NLS eremua oinarri hartuta, ikerketaren abiaburua KapA inportinak FlbB-ren garraioan nahiz nukleo barneratzean izan zezakeen bitartekaritza determinatzea izan zen. Eremu honen K68A eta R68A mutazioek FlbB-ren lokalizazio nuklearra inhibitzen zuten (Herrero-Garcia *et al.*, 2015) baina *ΔflbD* fondo genetikoan behatzean ez zen FlbB-ren dinamika eten zenik ikusi. Ondorioz, hasiera batean pentsa genezake NLS eremua, eta beharbada KapA inportina, nukleoetan barneratzeko

soilik, eta ez punta-nukleo arteko garraiorako, direla beharrezkoak. Alabaina, Trap<sup>®</sup> zutabeez egin ziren *pull-down* entsegetan ikusi zen, ahul bada ere, KapA eta FlbB elkar erretentzeko gai zirela, eta beraz, bien artean interakzio posible bat egon zitekeela. Entseguak NLS mutanteaz errepikatu zirenean, espero zitekeenaren aurka, erretentzio seinale sendoagoak detektatu ziren. Ordura arte, NLS (K67A; R68A) mutante akonidialean FlbB eta KapA arteko ustezko elkarrekintza bat kaltetua izango zela uste zen arren, *pull-down* emaitzek alderantzizkoa iradokitzen zuten, mutazio horiek bi proteinen arteko interakzio hipotetiko bat indartuko zutela. Kontuan izan behar da mutante hau zuzenduriko mutagenesi prozeduraz lortu zela, NLS bipartita kontsentsuan nahiz FlbB-ren ortologoetan oso kontserbatuak dauden (Cortese *et al.*, 2011) K67 eta R68 aminoazido positiboak izaera apolarreko alanina aminoazidoaz aldatu zirelarik (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Hain zuzen, hainbat ikerketetan ordezkatu izan dira ustezko NLS bati legezkiokkeen aminoazidoak alaninaz (*alanine scanning* mutagenesia)  $\alpha$ -importina eta kargo arteko lotura aztertzeko. (Hodel *et al.*, 2001) lanean kasu, NLS eremuko posizio desberdinetako aminoazidoak  $\alpha$ -inportinarekiko interakzioan zer nolako garrantzia zuten deskribatu nahian, aminoazido bakoitza alaninaz ordezkatu eta inportinarekiko afinitatea neurtzen zuten. Mutazioek  $\alpha$ -importina eta NLS peptido arteko afinitate galera eragin ohi zuten, nahiz eta ordezkatutako aminoazidoaren baitan baloreak asko aldatzen ziren. Edonola, FlbB-rekin itzuliz, ezezaguna zen alaninarekin ordezkatzeak nola eragingo zuen proteinaren egitura eta funtzionalitatean.

KapA eta FlbB<sup>(K67A;R68A)</sup> arteko elkarrekintza sendotuko balitz mutazioaren eraginez, aurrez  $\Delta flbD$  fondo genetikoan behatutako FlbB<sup>(K67A;R68A)</sup>::GFP-ren dinamika portaerek beste interpretazio bat egitera garamatzate. Interakzioa handitzen bada ezin genezake ziurtatu KapA-k FlbB-ren garraioan parte-hartzen ez duenik eta nukleo barneratzean soilik diharduenik. Aldiz, ezin uka daiteke K67A eta R68A mutazioek FlbB-ren lokalizazio nuklearrean eta konidiazioan duten efektua. Beharbada interakzioa indartzeaz, behin nukleoan, KapA-ren eta FlbB-ren askatzea inhibitzen da. Badira kargo eta karioferina arteko afinitate altuegiak garraio

#### 4. KAPITULUA:

---

mekanismoa kaltetzen dutela erakusten duten adibideak. Esaterako CRM1, ugaztunetan kargo desberdin gehien garraiatzen dituen esportina, NES (*nuclear-export signal*) seinalea daramaten proteinak nukleotik kanporatzen ditu. Lotura hau oso ahula izan ohi da zitoplasman kargoaren askatzea ahalbidetzeko. Horrela, CRM1-NES afinitatea handitzen duen NES mutazio baten kasuan deskribatu zen kargoa, zitoplasmara ezin kanporaturik, NPC-tan (*Nuclear Pore Complex*) trabatuta gelditzen zela CRM1 esportinarekin batera (Kutay eta Güttinger, 2005).

*Saccharomyces cerevisiae*-n, bestetik, badirudi Srp1p  $\alpha$ -inportinaren  $\beta$ -inportina lotzeko eremuko (IBB; *importin- $\beta$  binding domain*; autoinhibizio eremua dela ere esaten da, kargoaren NLS-arekin lotura inhibitzen baitu harekin lehiatuz; Lott eta Cingolani, 2011) 54-KRR-56 aminoazidoak mutatzean  $\alpha$ -inportina eta kargo arteko afinitatea handiagotzen dela, kargoaren askatzea zailduz (Harreman *et al.*, 2003b; Harreman *et al.*, 2003a), eta legamiaren hazkuntza bera ere kaltetuz (Harreman *et al.*, 2003b). Afinitatea igotzearekin batera,  $\alpha$ -inportinaren metatze nuklearra areagotu zela ere ikusi zen. Hau gure kasuan ez letorke bat FlbB<sup>(NLS\*)</sup> lokalizazio nuklearraren galeraz. Beraz, argi dago FlbB-ren K67A eta R68A mutazioen efektua determinatzeko hari mutur ugari dagoela. Etorkizunean, NLS eremuaren bitartekaritza ulertzeko, mutazio espezifikoekin lan egin beharrean, eremu honen delezioa daraman anduia sortzea aproposagoa litzateke. Beti ere, lehenik, NLS eremua eta KapA-ren arteko interakzioa baieztatu beharko genuke, horretarako *pull-down* (*in vitro* edo *in vivo*) entsegu egokiak diseinatuz. Adibidez, GST (*glutathione S-transferase*)-ra NLS eremua fusiona liteke pGEX-2T plasmidoan, *in vitro pull-down* entseguak burutzeko KapA::GFP kimeradun proteina erauzkinaz. Bestalde, KapA-k beraren IBB eremua (57-KRR-69) muta liteke, eta aztertu honek FlbB-rekiko ustezko loturan duen eragina. Gainera, kontutan hartu beharko litzateke ere IBB eremuaren mutazioak onddoaren hazkuntzarengan izan lezakeen eragin kaltegarria.

Bestalde, KapA-ren bitartekaritza zehazteko inportina berarekin zuzeneko esperimentuak egitea interesgarria litzateke, *kapA31* mutazio sentikorraz saiatu zen moduan. Kontuan izan behar da *kapA31* mutazio hau (Araújo-Bazán *et al.*, 2009) aurrez *Saccharomyces*

*Cerevisiae* legamian topatu zen *srp1-31p* mutazio termosentikorra (Tabb *et al.*, 2000) imitatu nahian sortu zela KapA-ren S111F aminoazido aldaketaz. Baina, ez dirudi guztiz errestriktiboa denik, (Araújo-Bazán *et al.*, 2009) lanean bertan azaltzen duten bezala. Lortutako emaitzetatik ezin izan dugu ondorio garbirik erauzi. KapA-ren bitartekaritza aztertzen jarraitze aldera interesgarria litzateke berezko mutazio termosentikorrak dituzten anduiak isolatzea eta fondo horietan FlbB-ren portaera determinatzea. Egun, Eduardo A. Espeso ikertzaileak (CIB-CSIC) isolatutako eta identifikatutako *kapA*-ren mutazio termosentikorrak baliatuz lan horretan dihardute laborategian. Mutante hauek, GFP-z etiketatutako KapA-ren forma mutante termosentikorrak adierazten dituztenak, fenotipo konidiantea dute tenperatura permisiboan baina, akonidiala tenperatura errestriktiboan, beti ere koloniaren hazkuntza erradiala kaltetu gabe edo modu ez adierazgarrian aldatuta. Helburua, fondo genetiko mutante horietan (baina mRFP edo HA<sub>3x</sub> etiketez) eta tenperatura errestriktiboan GFP::FlbB-ren lokalizazioa kaltetzen den ala ez aztertzea da. Andui horiek sortuak daude (Endika Diez ikaslearen GrAL-a), eta esan beharra dago transformanteek konidiazioaren inhibizio bat erakusten dutela tenperatura ez errestriktiboan, bi geneen artean nolabaiteko harreman genetiko bat egon daitekeela iradokiz. Fenotipo hau bat dator kapitulu honetan sortu ziren *kapA::mrfp; flbB::gfp* anduien fenotipoekin.

Dineina proteina motoreak distantzia luzetan burutzen duen garraio funtzioa dela eta, FlbB-ren garraio basipetalean parte har zezakeen aztertu zen. *nudA1* mutazio termosentikorrak, 37°C-tara, FlbB-ren lokalizazio nuklearra inhibitu izanak hipotesi hori indartzen du. Dineinak MT-etan zehar FlbB garraia balezake, aurrera begira garraio mekanismo hau nola burutzen den ikertzea interesgarria litzateke (ikus lan honen eztabaida orokorra). Bestalde, aipatzekoa da (Etxebeste *et al.*, 2013) lanean KapA beraren garraio zitoplasmikorako eta lokalizazio nuklearrerako dineina/dinaktina konplexuaren aktibitatea beharrezkotzat deskribatu zela. Beraz, dineinaren parte-hartzea bat etor liteke KapA-ren bitartekaritza ere.

FlbD-ren esku-hartzea ezinbestekoa da FlbB nukleoetan metatu dadin. Kapitulu honetan FlbD-ren cMyb eremuak eta C-terminaleko LxxLL eremuak funtzio honetan duten garrantzia

#### 4. KAPITULUA:

---

frogatu da. Bi eremuak proteinaren ertzetan kokatzen dira, eta proposatutako bien garrantzia biologikoa bat dator FlbD-ren ertzetakoren bat etiketatu denean aurkitu diren konidiazioa eragiteko eragozpenekin. Egoki etiketatze ezak azal lezake sarritan fluoreszentzia mikroskopioan edo immunodetekzio lanetan adierazpen maila baxuak sortutako arazoak (Garzia *et al.*, 2010).

cMyb eremua FlbD-ren ortologoetan bereziki kontserbatzen da, seguruenik DNA-ra lotzeko betetzen duen funtzioa dela eta (Arratia eta Aguirre, 2013). Kapitulu honetan cMyb eremuko (E14G;R87Q) mutante akonidial bat isolatu zen. *Fluffy* fenotipo hau bat letorke detektatu zen FlbB lokalizazio nuklearraren galeraz. Mutazioen eragina ulertze aldera E14 eta R87 aminoazidoen kontserbazio eta bibliografia azterketek gure begirada azido glutamikoan jarri dute. Myb eremuak 51-52 aminoazidoko sekuentzia R alditan errepikatuz osatzen dira. Errepikapen bakoitzak helize-bira-helize egitura hartzen du, DNA inguratu eta lotura ahalbidetzen duena (Ogata *et al.*, 1994; Arratia eta Aguirre, 2013). FlbD-ren kasuan bi errepikapenek osatzen dute cMyb eremua. Bada, E14 aminoazidoa R<sub>1</sub>-n aurkitzen dena, R<sub>2</sub> errepikapenean ere kontserbatzen da (E67-ren parekidea litzateke) (ikus 4.2. eranskinean A irudia). Bi R errepikapen hauetan kontserbatuta egoteak, nahiz beste espezieen ortologoetan E14 eta E67 aminoazidoen kontserbazio altuak, aminoazido horien garrantzia iradokitzen du (Wieser eta Adams, 1995). Hain justu, (Wieser eta Adams, 1995) egileek isolatu zuten *flbD* mutante akonidiala bigarren errepikapeneko E67-ren kodoiaren mutazio puntualari (E67K) dagokio. Gure kasuan bezala fenotipo akonidiala izateaz gainera, *brlA*-ren mRNA adierazpen patroia atzeratua deskribatu zuten. Aminoazido horien funtzioa azaltze aldera, (Ogata *et al.*, 1994) artikuluan oinarrituz E14, D15 eta E67 aminoazidoek R41, R49 eta R92-rekin gatz-zubiak osa ditzakete, hurrenez hurren (ikus 4.2B eranskina). Gatz-zubi horien mutazioek MYB eremuaren konformazioa aldatzeaz, DNA-rekiko lotura kaltetu dezaketela proposatzen da (Ogata *et al.*, 1994). Hain zuzen, (Hichri *et al.*, 2011) lanean, VvMYB5b TF-aren (MYB motako TF-a *Vitis vinifera* landarean) E67 eta R92 ustezko gatz-zubiaren baliokidea aztertu zuten argininaren mutatzear. Mutazioak TF-aren aktibazio transkripzionalerako gaitasuna kaltetu



zuela baieztatu zen, baina ezin izan zuten frogatu DNA-rekiko lotura inhibitu zenik. Bestalde, VvMYB5b-rekin batera transkripzio erregulazioan ziharduten ko-erregulatzailerikiko afinitatea ere kaltetu zela ikusi zuten. Modu berean, *E. coli* bakterioan CPR TF-an gatz-zubien garrantzia deskribatu zuten transkripzio erregulazio egokirako (Tutar eta Harman, 2006). Bertan, gatz zubia osatzen zuen E aminoazido baten mutatzeak CPR-ren DNA-rekiko afinitatea jaisten zuen. Baina hau, (cAMP) adenosin monofosfato ziklikoa mezulariaz interakzioa kaltetu zelako izan zela deskribatu zen, konplexu (CRP:cAMP) egokia osatu ezinaz. Horrela, aminoazidoaren aldaketak mekanismo alosterikoan eragin zuela proposatu zuten. Gatz-zubiko E-ren mutazioak RNA polimerasarekiko interakzioa ere inhibitu zezakeela deskribatu zen (Tutar eta Harman, 2006).

Hau guztia kontutan edukita, E14G mutazioa tresna aproposa izan daiteke FlbD eta FlbB-k *brlA*-ren transkripzioa erregulatzeko jarraitzen duten mekanismoa aztertzeko. Etorkizunean, interesgarria litzateke FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> proteina-DNA lotze EMSA entseguak burutzea, ea forma mutante hori DNA-ra, eta zehazki *brlA*-ren promotorera, lotzeko gai den. Mutazioak DNA-ra lotzeko gaitasuna kaltetuko balu, posible litzateke FlbD-ren deslokalizazioa ematea nukleoetatik, eta ondorioz FlbB bera ere nukleoetatik galtzea,  $\Delta flbD$  nuluan gertatzen den bezala. Egun, adibidez, cMyb eremuko C46 eta R47 aminoazidoek DNA lotzeko izan lezaketen funtzioa eta garrantzia proposatu dira (Arratia-Quijada *et al.*, 2012). Honen arabera 46. zisteinak redox sentso gisa joka lezake, eta zisteinaren oxidazioak DNA-lotura kaltetuko luke *in vitro*. Aldameneko argininaren karga positiboak zisteinaren pK<sub>a</sub> eta errebox ezaugarriak baldintzatuko lituzke.

Beste aukera posible bat litzateke bi proteinen arteko aurre elkarrekintza beharrezkoa izatea *brlA*<sup>P</sup>-ra lotzeko. Beraz, interesgarria litzateke bi proteinen arteko ustezko interakzioa FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> mutanteaz kaltetu litekeen aztertzea. Bestalde, aproposa litzateke FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> fondo genetikoan FlbB-ren *brlA*<sup>P</sup>-ra lotzeko gaitasuna ere aztertzea proteina-DNA lotze CHIP (*in vivo*) entseguez. Bi TF-en arteko interakzioa beharrezkoa balitz eta hau FlbD-ren mutante horretan kaltetuko balitz, FlbB DNA-ra ez lotzea espero genezake, eta hau aldi berean bat

#### 4. KAPITULUA:

---

etorriko litzateke kapitulu honetan deskribatutako FlbB-ren deslokalizazio nuklearrak. Kasurako,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan FlbB  $brlA^p$ -ra ez zela lotzen deskribatu zen (Garzia *et al.*, 2010) lanean.

Edonola, eta andui mutante honen bidez FlbD-ren cMyb eremuak FlbB-rekiko harreman molekular eta transkripzionalean duen garrantzia agerian utzi den arren, cMyb eremua soilik ez da nahikoa FlbB nukleotan pilatuko bada. Horrela, lan honetan ere ikusitakoaren arabera, FlbD-ren azken 10-15 aminoazidoak prozesu honetan beharrezkoak dira, beharbada transkripzioaren ko-erregulazioan edo/eta FlbB-rekiko interakzioan lagunduz. Azkenik, lan honetako emaitzek, (Garzia *et al.*, 2010) lanean bi TF-entzat proposatu ziren lotze dianak berrikusi beharko liratekeela iradokitzen dute. EMSA nahiz CHIP entsegu zehatzagoen faltan, ez dirudi FlbB eta FlbD  $brlA^p$ -ko eremu horietara lotzen direnik, ez bederen eremu horiek ezinbestekoak direnik konidiaziorako. Seigarren atalean, honen inguruko eztabaida zabalagoa osatuko da.

**5. KAPITULUA:**  
**Fosfato ioiek eragindako estrespean**  
**konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta**  
**mutatutako geneen identifikazio eta**  
**ezaugarritzea**



## 1. Sarrera.

Onartutako eredu genetikoaren arabera, *Aspergillus nidulans*-en garapen asexualaren indukzio eta progresioa bi bide nagusik kontrolatzen dute, UDA (*Upstream Developmental Activation*) eta CDP (*Central Developmental Pathway*) izenez ezagutzen direnak, hurrenez hurren. CDP bideak konidioforoaren osaketarako eman beharreko aldaketa morfologiko gehienak kontrolatzen ditu. UDA bideak, berriz, konidiazioarekin lotutako kanpo eta barne seinale espezifikoak hauteman eta horiek transduzitzen ditu, CDP bidea bera aktibatu behar den ala ez erabakitzeke. Bi bideen arteko zubi gisa dihardu BrIA transkripzio faktoreak (TF), UDA bideak kontrolatzen baitu *brIA*-ren espresioa eta, aldi berean, BrIA-k CDP bideko erregulatzailer nagusiak kodetzen dituzten geneen espresioa kontrolatzen baitu (Timberlake, 1991; Adams *et al.*, 1998).

UDA bideko FlbB TF-ak, beste hainbat erregulatzailerekin elkarlanean, *brIA*-ren espresioa kontrolatzen du (Garzia *et al.*, 2010); horregatik, *flbB* genearen delezioaz onddoaren konidiazioa inhibitzen da. Hori ikusirik, UDA bidearen funtzionamendu egokia ezinbestekoa dirudi *brIA*-ren espresioa eta, ondorioz, CDP bidea aktiba dadin. Alabaina, zenbait baldintzetan,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ioien kontzentrazio altuek eragindako estres egoeran kasu,  $\Delta flbB$  mutantean FlbB-ren gabezia gainditu eta onddoa konidiatzeko gai da (Etxebeste *et al.*, 2009a). Beraz, badirudi, aipatutako baldintzetan posible dela *brIA*-ren adierazpena eta, ondorioz, konidioforoaren sintesia bigarren bide alternatibo baten bidez aktibatzea.

Kapitulu honetan, arestian deskribatutako ezaugarri fenotipiko hau erabili zen abiapuntu bezala, batetik, UV-mutagenesi bidez fosfatoen (0.65M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) eraginpean ere *fluffy* fenotipo akonidiala izaten jarraitzen zuten anduien bilduma bat osatzeko. Bestetik, konidiaziorako ustezko bide alternatibo honetan, hemen SOSCon (*Salt-Osmotic Stress Conidiation pathway*) moduan adieraziko dena, parte hartu lezaketen efektoreak identifikatu eta ezaugarritzeko. FLIP (*Fluffy In Phosphate*) gisa izendatu ziren 81 mutante berri guztien artetik

## 5. KAPITULUA:

---

FLIP166 hautagaia aukeratu zen azterketarekin aurrera egiteko, eta fenotipo bereizgarri hori eragiten zuen mutazio eta gene mutatuaren identifikazioari heldu zitzaion. Era berean, FLIP166 mutanteak fosfatodun medioan duen fenotipoa ezabatzen duen SocA ustezko TF-a identifikatu eta ezaugarritu da.

## 2. Emaitzak.

### 2.1. FLIP (*Fluffy in phosphate*) mutanteen isolatze eta ezaugarritze fenotipikoa

#### 2.1.1. Ausazko mutagenesi prozeduraren bidez 81 FLIP mutante isolatu ziren.

Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatu ezin duten mutanteak lortzeko UV-erradiazio bidezko ausazko mutagenesia burutzea erabaki zen. Mutagenesirako, abiaburuko parental gisa, *flbB* genea ezabatua duen BD177 ( $\Delta flbB$ ) anduia aukeratu zen, ohiko hazkuntza medioan akonidiala bada ere,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gehitzean konidiatzeko gaitasuna berreskuratzen baitu.

Mutagenesiari ekin baino lehen, prozeduraren baldintza orokorrak ezarri behar izan ziren. Lehenik, kultura medioaren fosfato kontzentrazioa zehaztu zen. (Etxebeste *et al.*, 2009a) lanean adierazten den  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5M kontzentrazioa erreferentzia hartuta, fosfato kontzentrazio desberdinetan (0.5-1.0M)  $\Delta flbB$  parentalaren fenotipoa aztertu zen (5.1A eranskina). Mutagenesirako Petri plaketan 0.65M-eko  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  kontzentrazioa erabiltzea erabaki zen, balio honetan fenotipo konidiantea nabaria izaki hazkuntzaren edozein inhibizio saihestu nahi baitzen.

Bigarrenik, mutagenesia eragingo zuen UV erradiazioaren uhin-luzera eta esposizio denbora zehaztu behar izan ziren. Laborategiko UV lanparak eskaintzen zituen bi uhin-luzeren artean energia maila altueneko erradiazioa igorriko lukeena (254nm) erabiltzea erabaki zen. Irradiazio denborari dagokionez, inokulatuko ziren konidien %5-10-eko biziraupen-tasa

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

ahalbidetuko zuen 80-100 segundotan finkatu zen esposizio denbora. 5.1B eranskinean erakusten dira baldintzen optimizaziorako egindako probak eta dagozkien azalpenak.

Mutagenizatutako konidioak 72 orduz inkubatu ziren 0.65M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -dun MMA plaketan, *fluffy* fenotipoa zuten koloniak identifikatuz (5.1C eranskina). Isolatutako ustezko FLIP hautagai guztiez egiaztapen fenotipiko eta genotipikoak burutu ziren, Materialak eta Metodoak kapituluan, 4. atalean eta 2.1. irudian ikus daitekeen moduan. Guztira, 11000 mutante aztertu ziren (gutxi gora behera, *A. nidulans*-en genomak gordetzen dituen geneak adina) eta FLIP fenotipoa zuten 81 hautagai identifikatu.

### 2.1.2. FLIP hautagaien ezaugarritze eta sailkatze fenotipikoa.

Isolatutako 81 FLIP mutanteek ezaugarri fenotipiko anitzak erakusten zituztenez, horien arabera sailkatzea erabaki zen. Lehenik, ausazko mutagenesia izaki, mutanteren batek jada konidiazioaz lotura ezaguna zuen generen bat mutatua zuen erdietsi nahi izan zen. Horretarako, UDA bideko hainbat mutante nulo,  $\Delta flbC$ ,  $\Delta flbD$ ,  $\Delta flbE$ ,  $\Delta tmpA$ ,  $\Delta tmpB$ , eta  $\Delta fluG$  nahiz  $\Delta brlA$ , erabili zen erreferentzia gisa FLIP mutanteen fenotipoak elkar konparatzeko, bai ohiko MMA medioan nahiz fosfatodun (0.65M) MMA medioan.  $\Delta tmpA$  eta  $\Delta tmpB$  anduiek bi medioetan konidiatzen zuten. Aldiz,  $\Delta flbE$  eta  $\Delta fluG$ , MMA medioan mutante akonidialak baziren ere, fosfatoaren eraginpean konidiatzera ailegatu ziren,  $\Delta flbB$ -ren moduan.  $\Delta flbC$  anduiaren kasuan, MMA medioan 72 ordura Hülle zelula ugari agertzen ziren; FLIP mutanteetan ez zen halako fenotiporik begiztatu. Bestalde,  $\Delta brlA$  erreferentzia anduia ere baztertu egin zen, fosfatodun medioan guztiz akonidiala izanik ere, mikroskopiopon fenotipo bereizgarria izaki ez baitzen pareko fenotiporik antzeman. Erreferentzia anduien eta FLIP mutante espezifikoen arteko antzekotasun bakarra  $\Delta flbB$ ,  $\Delta flbD$  nulo bikoitzarekiko hauteman zen. Ondorioz,  $\Delta flbB$ ,  $\Delta flbD$  nulo bikoitzarekiko antzeko ziren mutantez lehen talde bat bereizi zen ( $\Delta flbD$ -ren antzekoak, 1go taldea). Bertan sailkatutako mutanteak, *flbD* genea mutatu izanaren ondorio izan

## 5. KAPITULUA:

---

zitezkeela aintzat harturik, 2.2.2. puntuan azalduko den moduan sakonago aztertu ziren. Lehen talde honetaz gain, ezaugarri fenotipikoen baitan, ondorengo 7 taldetan bereizi ziren 81 FLIP mutanteak (ikus 5.2. eranskinean FLIP mutante bakoitzaren fenotipo eta deskribapena): 1) *ΔflbD*-ren antzekoek (20 mutante; %24), erdialdean konidiazio arina erakusten zuten; 2) *fluffy* fenotipo nabarmena baina, bestelako ezaugarri bereizgarriak ez zutenak (29 mutante; %36); 3) erdialde-bustia erakusten zutenak, autolisi kasuak izan zitezkeelarik (8 mutante; %10); 4) hazkuntza-kaltetua, jatorrizko anduiarekiko diametro txikiagoa zutenak (8 mutante; %10); 5) fosfatotan egonkortuak, itxuraz 0.65M fosfatodun MMA-n hobeto hazten baitziren (5 mutante; %6); 6) konidiazio apur bat aurkeztuta ere *ΔflbD*-ren antzik ez zuten mutanteak (3 mutante; %4); eta 7) bestelakoak, ezaugarri amankomunik gabeko mutanteak eta aurreko taldeetan sailka ezin zitezkeenak (8 mutante; %10).

### 2.1.2A. FLIP mutanteen ezaugarritze fenotipikoa medio desberdinetan.

Ordu arte, FLIP hautagaiek fosfato-estres baldintzapean duten fenotipoa aztertu genuen; alabaina, bestelako estres egoeretan ere mutanteen jokabidea aztertu nahi izan zen. FLIP mutanteen konidiazio ezintasuna fosfatoarekiko espezifikoa den edo estres baldintza desberdinen aurrean erantzun orokor gisa ematen den aztertzearen, estres egoera induzi zezaketen baldintza desberdinetan hazi ziren FLIP anduiak (Ikus Materialak eta Metodoak kapitulua).

Besteak beste, karbono (glukosa) edo nitrogenua (amonio nitratoa) iturriak MMA medioan duten kontzentrazioaren bostenera diluitu ziren (5.1. irudia, 3 eta 4. zutabeak), baina ez zen hautagaien konidiazio mailan aparteko aldaketarik antzeman. Are gehiago, jatorrizko *ΔflbB* anduiak berak ere ez zuenez konidiatzen baldintza hauetan, ezin izan zen ondorio azpimarragarrikerik atera. Kultura mediora 6mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehitzean (5.1. irudia 6 zutabea) ere ez zen



## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

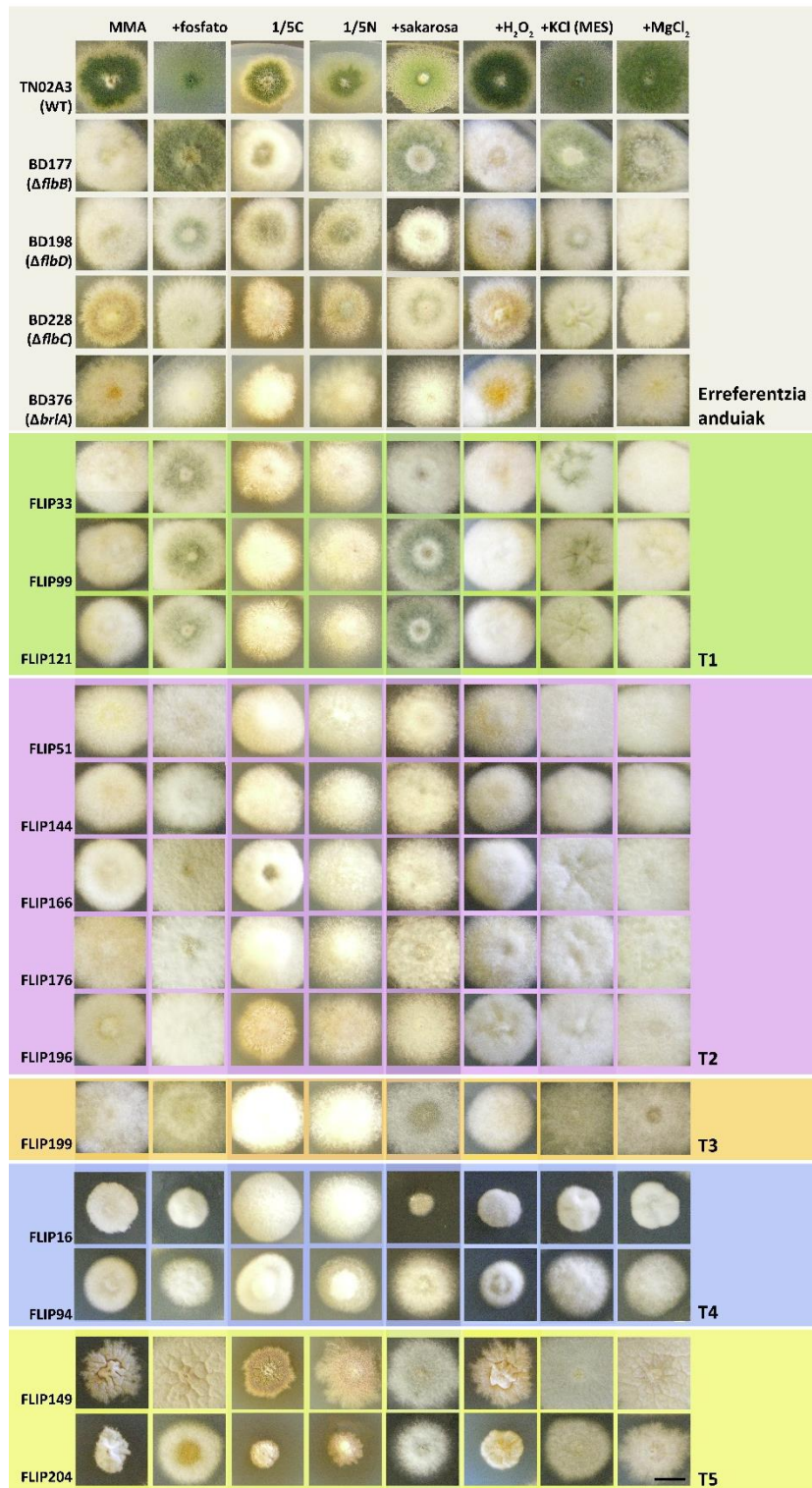
---

bereizgarri izan zitekeen fenotipo aldaketarik nabaritu, ez FLIP mutanteen artean ez eta erreferentzia andueiz.

Sakarosa, KCl+MES eta  $MgCl_2$  konposatu kimikoak izan ziren, fosfatoaz batera,  $\Delta flbB$  parentalarengan konidiazio zantzu nabariak eragin zituzten konposatuak (5.1. irudia, 5, 7, 8 eta 2. zutabeak, hurrenez hurren). FLIP mutanteek fosfatotan erakutsiriko fenotipo ezaugarriak errepikatu zituzten estres mota horien eraginpean. Alabaina, 1M sakarosa zuen kultura medioan, 0.65M fosfato zuenean ez bezala,  $\Delta flbD$ -ren antzekoak direnen taldeko zenbait FLIP mutantek (ikus 5.1 irudian FLIP99 eta FLIP121) konidiatu egiten zuten. Erreferentziako  $\Delta flbD$  anduiak, fosfatotan apur bat konidiatzeko gai dena, sakarosetan ez du konidiatzen eta, beraz, ustez  $\Delta flbD$ -ren antzekoak ziren hainbat hautagai ezeztatzeko balio izan zuen 1M sakarosadun medioak (ikus 5.3. Eranskina eta hurrengo 2.1.2B. atala). Mutante hauek FLIP fenotipoa eragiten zuen mutazioa ez zutela *flbD* genean izango ondorioztatu zen horrela.

Bestalde, mediora  $0.65M H_2PO_4^-$ , fosfato azidoa, gehitzean hazte medioaren pH-a jaitsi egiten da. Inguruaren azidotze honek estres eragile gisa joka dezake, eta beraz konidiazioaren indukzioa, fosfato gatzak ez ezik, inguruaren azidotzeak eragin zezakeela pentsa liteke. Konidiazioan pH-ak izan zezakeen eragina aztertzeko hainbat kultura medio prestatu ziren (Materialak eta Metodoak kapituluko 2.1. puntuan azaltzen dira). FLIP hautagaiak ez ziren ondo hazi inguru horietan, nahiz eta ez zuten konidiaziorik aurkeztu (ez erakutsia). Beraz, ezin izan zen ondorio garbirik atera. Ostera, kasu honetan, KCl(+MES) gatza gehitzean ikusitakoa hartu behar da aintzat. KCl-k, fosfatoak ez bezala, ez du pH aldaketa nabarmenik eragiten medioan. Gainera, pH-a 6.8 inguruan mantentzea MES tanpoia ere (0.05M) gehitu zen. Beraz, KCl medioan pH-aren eragina arbuigarria da baina, aldi berean, FLIP mutanteek fosfatotan erakutsiriko fenotipo bera aurkeztu zuten (ikus 5.1. irudia). Honek, ikusitako FLIP fenotipoak ez direla  $H_2PO_4^-$ -ak hazkuntza medioa azidifikatu izanaren ondorio iradokitzen du, gatz kontzentrazio altuen ondorioa baizik.

## 5. KAPITULUA:



**5.1. irudia: Talde bakoitzeko FLIP mutante adierazgarrienen fenotipoa estres egoera desberdinetan.** Ezaugarritze eta konparaketa fenotipikorako hainbat kultura medio prestatu zen MMA-ra ondoko konposatuak gehituz: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.65M), sakarosa (1M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6mM), KCl/MES (0.6M/0.05M); bestetik, karbono nahiz nitrogeno iturriak bostenera murriztutako medioak ere erabili ziren. Medio bakoitzean erreferentziako andui basatiaz eta nulo akonidiaz ( $\Delta flbB$ ,  $\Delta flbD$ ,  $\Delta flbC$  eta  $\Delta brlA$ ) batera talde desberdinetako FLIP hautagaiak hazi ziren 72 orduz 37 °C-tan. Saillkapen taldeetatik lehen bost taldeak aurkezten dira: 1)  $\Delta flbD$ -ren antzekoak zirenak; 2) *fluffy* fenotipo nabarmena izaki, bestelako ezaugarri bereizgarririk ez zutenak; 3) erdialde-bustia aurkezten zutenak; 4) ohikoa baino kolonia diametro txikiagokoak eta 5) itxuraz fosfatotan egonkorrago hazten zirenak. Eskala barra = 1 cm.

**Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea**

2.1.2B. FLIP33 eta FLIP104 hautagaiak ez dute mutaziorik *flbD* genean.

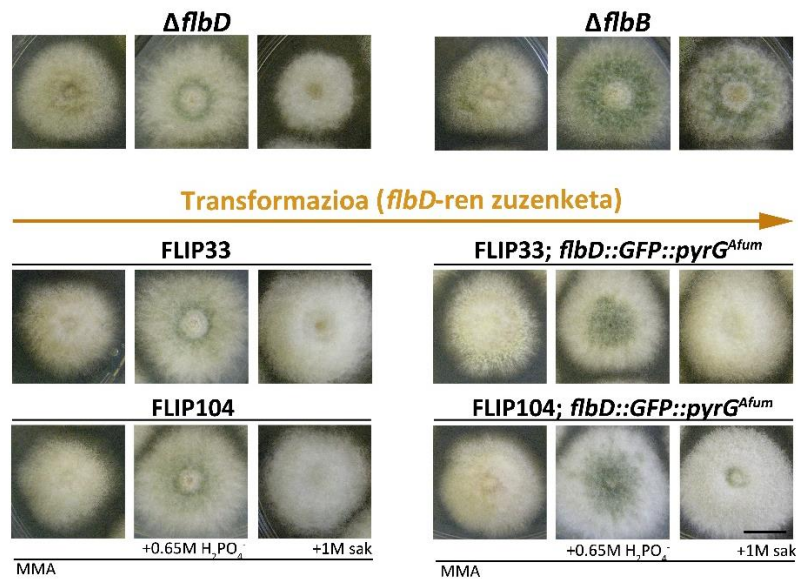
Lan honen helburua fosfato estrespean konidiazioa aktiba dezaketen efektore berriak identifikatzea izanik, aurretik karakterizatuak izan diren elementu ezagunak ikerketa fokutik kanpo leudeke hasiera batean. Aurreko atalean, lehen taldean sailkatutako mutanteek  $\Delta flbD$  anduiaren antza erakusten zuten, nahiz eta sakarosan 1M zen medio batean erreferentziazko andui honekiko fenotipo desberdina erakutsi gehienek. Sakaroadun medioan, talde honetako FLIP mutante batzuk konidiatu egiten zuten beste batzuk fenotipo *fluffy*-a mantentzen zuten bitartean (5.3 Eranskina, 5.1. taula), bi azpitalde desberdinduz.

**5.1. Taula:** Fosfatotan ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.65M)  $\Delta flbD$  mutantearen antzeko fenotipoa zuten FLIP hautagaiak, 1M sakaroadun medioan 37 °C-tan 72 orduz kultibatu ondoren aurkeztu zuten fenotipoaren arabera bi azpitaldeetan banatuak. Ikus ere 5.3 Eranskina.

|  | 1M SAKAROSEAN  | FLIP   |
|--|--|--|
| <b>Fosfatotan <math>\Delta flbD</math>-ren antzeko fenotipoa duten FLIP-ak</b> | <b>EZ DUTE KONIDIATU</b><br>( $\Delta flbD$ -k bezala) | 13, 33, 39, 52, 104, 158                           |
|  | <b>KONIDIATU DUTE</b><br>( $\Delta flbD$ -k EZ bezala) | 36, 41, 45, 46, 77, 79, 92, 99, 121, 122, 143, 200 |

Bai sakarosa eta bai fosfatodun medioetan  $\Delta flbD$ -ren antza duten FLIP mutante hauen mutazioa *flbD* genean egon zitekeenez, horietako biren protoplastoak (FLIP33 eta FLIP104) *flbD::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* kasetteaz transformatu ziren. DNA konstrukzioaren errekonbinaketa *flbD* locus-era bideratu zen, mutaturak egon zitekeen FLIP mutanteen *flbD* alelo natiboa bertsio basatiaz ordezkatzuz. Horrek,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun edo sakaroadun medioetan FLIP mutante horiek erakusten dituzten fenotipoak leheneratu beharko lituzke, parentalaren fenotipo konidianta bera eraginez bi medioetan. Bi kasuetako batean ere ez zen horrelako leheneratzerik ikusi (5.2 irudia), bi mutante horiek FLIP fenotipoa eragiten duten mutazioak *flbD* ez den beste geneetan dituztela ondorioztatu zelarik.

## 5. KAPITULUA:



**5.2. irudia:**  $\Delta flbB$ ,  $\Delta flbD$ , eta lehen taldeko FLIP33 eta 104 anduien fenotipoa MMA eta 0.65M fosfato edo 1M sakaroadun MMA-n, 72 orduz 37°C-tan kultibatu eta gero. FLIP mutante horien protoplastoak *flbD::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* cassette-az transformatu ostean duten fenotipoa ere erakusten da. Aztertutako medioetan bi FLIP mutanteetatik batek ere ez du  $\Delta flbB$  parentalaren fenotipoa berreskuratzen ez fosfatodun ez eta 1M sakaroadun MMA-n. Horregatik, FLIP mutazio ezezaguna *flbD* ez den beste gene batean aurkitzen dela ondorioztatu da. Eskala barra = 1 cm.

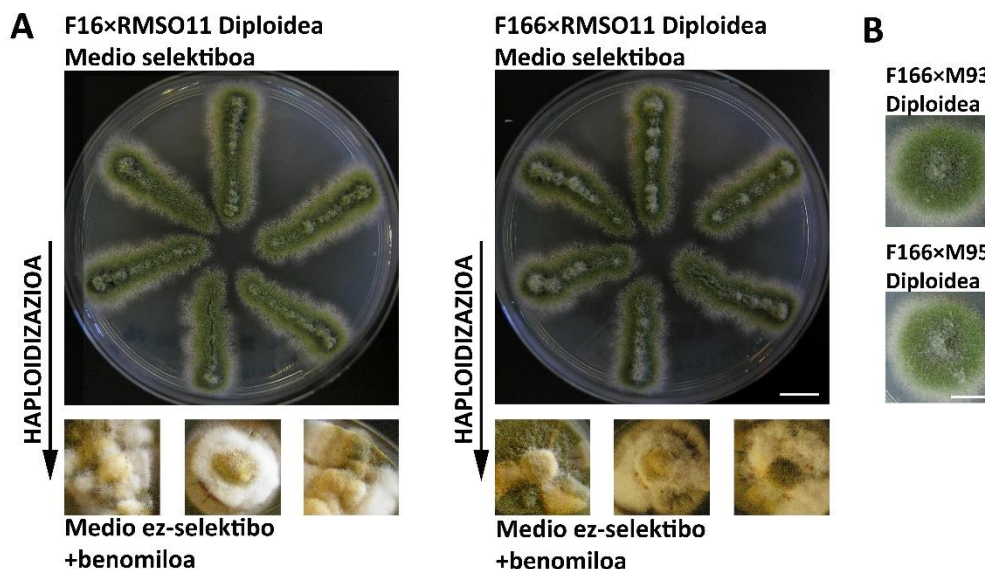
### 2.2. FLIP166 fenotipoaren erantzule den mutazioaren identifikazioa.

#### 2.2.1. FLIP16 eta FLIP166 fenotipoen erantzule diren mutazioak azpirakorrak dira.

Behin mutanteen karakterizazio fenotipiko orokorra burututa, FLIP16 (hazkuntza mugatuko FLIP mutanteen taldean kokatua; 4. taldea) eta FLIP166 (*fluffy* fenotipo nabarmena duten FLIP mutanteen taldekoa; 2. taldea) aukeratu ziren identifikazio lanaz jarraitzeko. Lehenik, mutante horietan FLIP fenotipoa eragiten zuten mutazioak azpirakorrak ala gainartzaileak ziren jakin nahi izan zen. Horretarako, FLIP mutante bakoitza konidia horidun BD2 (RMSO11) andui konidiantearekin gurutzatu eta FLIP16×BD2 eta FLIP166×BD2 diploideak sortu ziren, hurrenez hurren (Materialak eta Metodoak kapituluan 7. atala; ikus ere 5.3A irudia). Sortutako bi egiturak diploideak zirela baieztatu zen MCA kultura medio ez-selektiboan benomiloa (2μL/mL) gehituz eta bai fenotipo konidiantea edo bai akonidiala zuten esporea hori edo berdedun haploideak lortuta (5.3A irudia, behean). Bi diploideek esporea berdedun fenotipo basati konidiantea

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

erakusten zutenez MMA medio selektiboan (alelo basatiak alelo mutatuaren eragina konpentsatu baitezake), FLIP16 eta FLIP166 fenotipoak eragiten zituzten mutazioak azpirakorrak zirela ondorioztatu zen.



**5.3. irudia: FLIP hautagaien diploideak eta haien haploidizazioa.** A) FLIP16xBD2 eta FLIP166xBD2 diploideak medio selektiboan haztean fenotipo konidiantea dute. Beraz, FLIP fenotipoa eragiten duten mutazioak azpirakorrak dira bai FLIP16 baita FLIP166 hautagaian ere. Diploideak zirela ziurtatzeko, MCA medio ez-selektiboan diploideen haploidizazio froga burutu zen 2  $\mu$ L/mL benomilo gehituz. Behealdeko irudietan, fenotipo desberdineko haploideak bereizten dira. Eskala barra = 1 cm. B) FLIP166xM93 eta FLIP166xM95 diploideen fenotipoa MMA medio selektiboan. FLIP166 hautagaia, M93 eta M95 erreferentzia anduiez ere gurutzatzean lortu ziren bi diploideok. Fenotipo konidiantek FLIP166 fenotipoa eragiten zuen mutazioaren izaera azpirakorra berresten du. Eskala barra = 1cm.

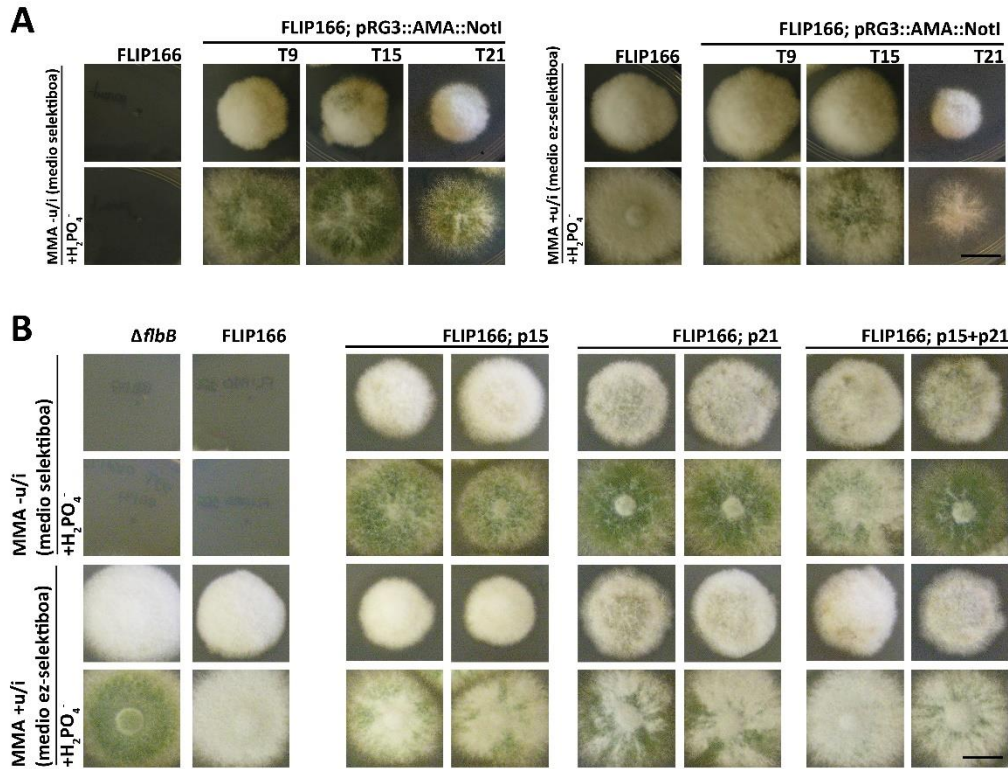
### 2.2.2. AN8501/socA-ren neurritz gairaz gaindiko adierazpenak FLIP166-ren fenotipo akonidiala

ezabatzen du: FLIP166-ren protoplastoen transformazioa genotekaz.

Aurrera begira, FLIP166 mutantearekin lanean jarraitzea erabaki zen, fosfatodun medioan *fluffy* fenotipo nabarmena zuelako. Bere fenotipoaren erantzule den mutazioa lokalizatu ahal izateko lehen estrategia gisa, FLIP166-ren protoplastoak genoteka basati batekin transformatzea proposatu zen. Genoteka hau pRG3-AMA1-NotI plasmido autoerreplikatiboan dago eraikita (Osharov, N. 2000; Materialak eta Metodoak kapitulu 5.4. atala) eta *A. nidulans*-en genoma osoa ordezkatua dagoela onartzen da. Protoplastoak genotekaz transformatzean,

## 5. KAPITULUA:

baten batek FLIP166 mutazioari dagokion eremu genomikoa hartuko balu, mutazioa konpentsatu eta transformanteak parentalaren fenotipo akonidiala leheneratuko luke  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun medioan.



**5.4. irudia: pRG3-AMA1-NotI genoteka basatiaren erabilera FLIP166 mutazioa lokalizatzeko.** A) FLIP166 mutantearen protoplastoak genotekaz transformatu ostean, fosfatotan konidiatzeko gai ziren transformanteak isolatu ziren milaka transformanteren artean. T9, T15 eta T21 transformanteak ikus daitezke irudian. Medio selektiboan (-u/i; uridina eta urazilo gabe) fosfatoaz konidiatzeko gai dira,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gabeko MMA medioan fenotipo akonidiala erakusten duten bitartean. Alabaina, medio ez-selektiboan (+u/i; uridina eta uraziloduna; irudian eskubian) plasmidoa kanporatzen dute eta jatorrizko FLIP166-ren fenotipo *fluffy*-a berreskuratzen dute fosfatodun kultura medioan. Eskala barra = 1cm. B) A atalean erakutsitako errebertienteetatik inserto ezezaguneko pRG3::AMA::NotI plasmidoak erazi eta berriro FLIP166-ren protoplastoak transformatu ziren plasmido bakoitzaren laginekin. Irudian, p15 plasmidoarekin (T15 transformantetik erazitakoa; *An8501* eremua darama; Ikus aurrerago), p21 plasmidoarekin (T21etik erazitakoa; *flbB* eremua darama) edo biek batera lortutako bina transformante erakusten dira.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun eta gabeko medio selektiboan edo ez-selektiboan transformante sorta bakoitzak erakusten duen fenotipoa azaltzen da, parentalarekin (FLIP166 eta  $\Delta flbB$ ) konparatuta, eta 37°C-tan 72 orduz inkubatu eta gero. Eskala barra = 1cm

Transformanteen artean, konidiatzeko gai ziren horiek aukeratu ziren.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun (0.65M) MMA medio selektibora (uridina eta urazilo gabekoa) transferitu zen ustezko errebertiente bakoitza, konidiatzeko gai zirela baieztatzeko, beti ere fosfato gabeko medioan

## **Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea**

---

zuten fenotipoarekin (akonidiala) konparatuz (5.4A irudia). Aldi berean, medio ez-selektiboan (uridina eta uraziloduna) *fluffy* izatera igarotzen ziren hautagaiak, presio selektiboa kentzeaz batera ondoak plasmidoa kanporatzeko joera baitu eta, beraz, plasmidoak emandako konidiatzeko gaitasuna galtzen du (5.4A irudia, behean).

### 2.2.2A. T15 transformante errebertienteak AN8501 geneari zegokion plasmidoa zeraman.

Irudian (5.4) erakusten den bezala, hasiera batean, T9, T15 eta T21 transformante errebertienteak aukeratu ziren. Bakoitzetik plasmidoak erauzi eta insertoak sekuentziatu egin ziren (CIB-CSIC-eko Eduardo A. Espeso doktoarearekin kolaborazioan). Batetik, *p9* eta *p21* plasmidoek *flbB locus*-ari dagokion eremua zeramaten (5.4 Eranskina). Kontutan hartuta FLIP mutante guztiak  $\Delta flbB$  genotipodunak direla, honek adierazten du FLIP166 fenotipoa *flbB*-ren delezioak eta mutazio ezezagunak eragindako efektuen baturaren ondorio dela, eta mutazio ezezagun hori ez dela nahikoa FLIP166 fenotipoa eragiteko. Bestetik, *p15* plasmidoak *A. nidulans*-en V. kromosoman kokatutako eremua jasotzen zuen. Eremu horretan AN8501 genea aurkitzen da (5.4 Eranskina).

Behatutako leheneratze fenotipikoa baieztatzeko, FLIP166-ren protoplastoak *p15* plasmidoarekin, *p21* plasmidoarekin edo *p15-p21* plasmidoen nahaste batez transformatu ziren (5.4B irudia). Plasmido bakoitzak FLIP166 fenotipoaren leheneratzea eragiten zuen (*p21*-k maila handiagoan) 0.65M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-dun medio selektiboan batean. Leheneratze hori, berriz ere, galdu egiten zen fosfatodun medio ez-selektiboan, plasmidoak galtzearen ondorioz. Emaitzek berriz ere baieztatu zuten FLIP166-n identifikatu nahi zen mutazio ezezagunaren eta *flbB*-ren delezioaren efektuen baturak eragiten zuela FLIP mutante horren fenotipoa.

## 5. KAPITULUA:

---

2.2.2B. FLIP166 fenotipo akonidiala ez da AN8501 genea mutatzearen ondorio baina, bere gain-adierazpenak FLIP166 fenotipoa lehenarazten du.

FLIP166-ren fenotipoa eragiten duen mutazioa *An8501* genean egon zitekeelakoan, bere DNA genomikoa erauzi, *An8501* eremua amplifikatu eta sekuentziatu egin zen. *Aspergillus genome database* (<http://aspergillusgenome.org/>) datu baseak *AN8501* geneari 2146bp iragartzen dizkio, 6 exoietan eta 5 introietan banatuta. Sekuentziazioak adenina baten ordezkapenaren berri eman zuen, 1172. nukleotidoan, guanina batez (A1172G). Aldaketa genearen 4. introian kokatzen da. Gure RNA-seq datuek (Garzia *et al.*, 2013; Oartzabal-Arano *et al.*, 2015) introi hori ondo prozesatzen dela erakutsi arren, irakurketa bakan batzuk agertzen ziren eremu horretan, bai andui basatian baita  $\Delta flbB$  anduiaren ere. Irakurketa horietan ere (5.5A irudia, eskubian) FLIP166-n identifikatutako aldaketa bera ikusten zen. Beraz, ez zirudien FLIP166 fenotipoa mutazio zehatz honen ondorio zenik. Horregatik, *AN8501* genea FLIP166 fenotipoaren multikopia supresorea izan zitekeela ondorioztatu zen eta *socA* (*suppressor of the FLIP conidiation phenotype*) izena eman zitzaion. Bestalde, anotazio errore bat ere antzeman zen datu baseak iragarritako lehen exoian (5.5A irudia, ezkerrean). Gure RNA-seq analisiek lehen exoia datu baseak zioena baina luzeagoa zela erakusten dute, eta horrek aldi berean, hasierako kodoiaren aurreikuspena eguneratzera eraman gintuen. Zuzenketa hori dela eta, eremu funtzionalen azterketan (ikus beheago) garrantzitsuak izango ziren kodoiak gehitu ziren, proteinaren luzera 592 aminoazidotan utziaz.

*The European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) erakundeak eskuragarri duen InterPro plataforman SocA-ren aminoazido sekuentzia zuzenduaren eremu funtzionalen analisia burutu zen. Algoritmoak, Zn<sup>2</sup>-Cys<sub>6</sub> zink hatz baten (IPR001138) presentzia iragartzen du N-terminal muturrean eta *Fungal transcriptional regulatory domain* (IPR021858) eremua C-terminal aldean,





## 5. KAPITULUA:

---

**5.5. irudia: SocA-ren azterketa bioinformatikoa** A) *socA* sekuentziaren azterketa. Goiko irudikapenean AspGD (<http://www.aspgd.org/>) eta FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/>) datu baseek iragarritako exoi eta introien kokapen eta luzerak erakusten dira. Horiak, FLIP166-ren DNA sekuentziazio (Ikus aurrerago) eta erreferentziazko  $\Delta flbB$  eta WT anduien RNA-seq datuekin alderatzen dira. Eskuinaldean, FLIP166 anduiaren identifikatutako mutazio intronikoa (\*1) erakusten da, berau erreferentziazko anduien RNA-seq irakurketa bakantetan ere agertzen delarik. Beraz, ezin esan liteke FLIP166 fenotipoa mutazio horren ondorio denik. Ezkerraldean, datu baseek iragartzen duten lehen exoi eta introiari dagozkion RNA-seq irakurketak erakusten dira. Lehen exoiaren luzera handiagoa dela eta (\*2), aurreikusitako hasiera kodoia (\*3) okerra da eta \*4 kodoian legoke. Behean, InterPro plataformak SocA-ren sekuentzia zuzenduari eginiko eremu funtzionalen iragarpina agertzen da. Adierazitako bi eremuek transkripzioaren erregulatzailer funtzioa lukete. B) SocA-ren ortologoaren sekuentziaren eraikitako zuhaitz filogenetikoa. Kolore gorriaz Onygenales ordeneko espezieen SocA-ren ortologoak ageri dira; kolore berdean eta lilan aldiz, Eurotialesen barruan *Aspergillaceae* eta *Trichocomaceae* familietako espezieen ortologoak bereizten dira, hurrenez hurren. Karratu laranja AN8501/SocA bera adierazten du. Bi adar berde bereizten dira (*Aspergillaceae* familiako espezieen artean), honek familia honetan gertatu zen SocA-ren bikoizketa hipotetiko bat iradokitzen duelarik. Adar batean *A. nidulans*-n SocA-ren ortologoak biltzen dira (SocA bera aurkitzen den adarra) eta bigarren adarrean kokatuko lirateke berauren paralogoak. Zuhaitz filogenetiko hau O. Etxebeste-rekin batera eraiki zen.

Bestalde, BLAST azterketek SocA-ren ortologoak identifikatu zituzten Eurotiomizetoen barruko Eurotiales eta Onygenales ordenetako espezieetan (5.5B irudia). *Aspergillaceae* familiako zenbait espezieetan, gainera, paralogo baten presentzia ere detektatu zen. Alegia, zenbait espeziek SocA-ren bi ortologo zituzten, beste batzuk (*A. nidulans* bera kasu) bakarra zuten bitartean. Honek, SocA Eurotiomycetes klasean sortu zela, eta bere eboluzioak gutxienez bikoizte gertaera bat izan zuela iradokitzen du.

### 2.2.2C. SocA-ren ezaugarri funtzionala.

SocA-k konidiazioan izan zezakeen ustezko parte-hartzea ezagutu nahian, funtzionalki ezaugarritzeari ekin zitzaion. Hasteko, *socA*-ren mutante nulua eraiki zen, bai fondo genetiko basatian bai  $\Delta flbB$  fondo nuluan ere. Izan ere, gogoan izan behar da FLIP166 berak  $\Delta flbB$  genotipoa duela. Bestalde, bere lokalizazio subzelularra aztertzeko eta proteina immunodetekzioz detektatu ahal izateko, SocA::GFP edo SocA::HA<sub>3x</sub> kimerak adierazten zituzten anduiak ere eratu ziren, hurrenez hurren, biak berriz ere fondo genetiko basatian eta *flbB*-ren nuluan. Azkenik, SocA::GFP edo SocA::HA<sub>3x</sub> kimerak *gpdA<sup>P</sup>* promotorearen eraginpean

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

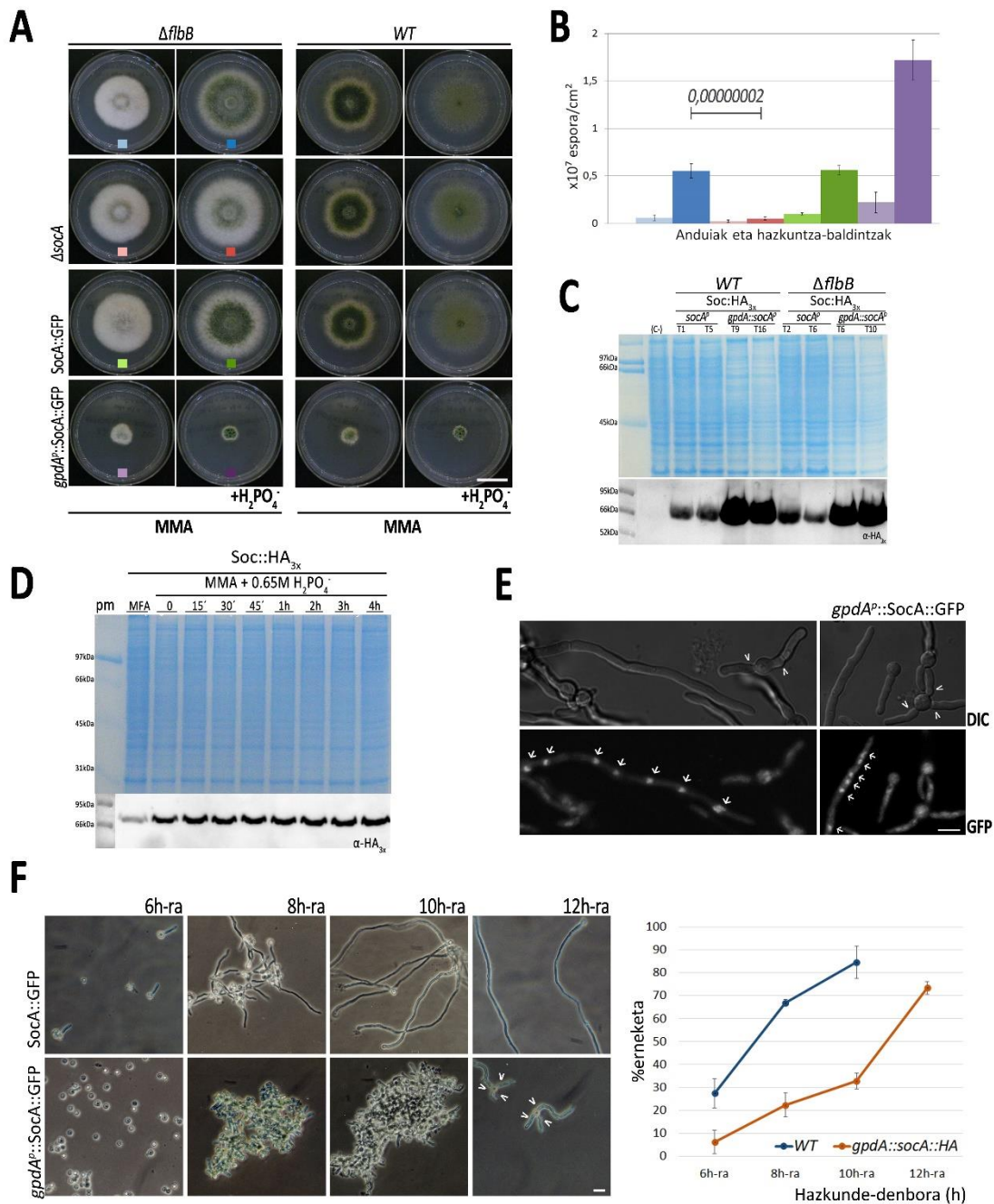
adierazten zituzten anduiak sortu ziren, goian aipatutako bi fondo genetikoetan, *socA*-ren momentu oroko gainadierazpenak dituen eraginak aztertu ahal izateko.

Fondo genetiko basatian *socA*-ren delezioak ez zuen onddoaren konidiatze gaitasunean edo hazkuntzan aldaketarik eragin, ez fosfatodun medioan ezta fosfato gabekoan ere (5.6A irudia). Beraz, SocA-ren gabezia bere baitan ez da nahikoa garapen asexuala inhibitzeko. Aldiz,  $\Delta flbB$  fondoan *socA*-ren delezioak konidia produkzioa modu estatistikoki esanguratsuan inhibitzen zuen 0.65M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun MMA kultura medio batean (5.6A irudia). Inokulatu eta 48 ordura, 0.65M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  zuen kultura medioan  $\Delta flbB$  erreferentziazko anduiak  $5.54 \times 10^6 \pm 0.22 \times 10^6$  konidia/cm<sup>2</sup> ekoitzi zituen, nulu bikoitzean ( $\Delta flbB, \Delta socA$ ) kopurua  $0.53 \times 10^6 \pm 0.19 \times 10^6$  konidia/cm<sup>2</sup> izan zen bitartean ( $p < 0.0001$ , aldaketa adierazgarria;  $n = 6$  lagin andui bakoitzeko; 5.6B irudia). Hain zuzen, FLIP166-n espero zitekeen fenotipoa errepikatzen da.

SocA::GFP anduien kasuan, fenotipoan ez zen aldaketa esanguratsurik antzeman fondo genetiko basatian; badirudi, beraz, etiketak ez duela proteinaren funtzionalitatean eragiten ezta onddoaren fenotipoan ere. Erreferentziazko *flbB* nuluarekin alderatuz, ( $\Delta flbB; socA::gfp$ ) anduiak konidiazio patroian aldaketa arinak erakusten zituen arren, konidioen kuantifikazioak ez zuen aldaketa estatistiko esanguratsurik eman ( $5.63 \times 10^6 \pm 0.47 \times 10^6$  konidia/cm<sup>2</sup>;  $p = 0.84$ ;  $n = 3$  lagin; 5.6B irudia). Aldiz, *gpdA<sup>p</sup>* promotorearen eraginpean onddoak hazkuntza kaltetua azaltzen zuen, aztertutako bi fondo genetikoetan. Koloniaren diametroa ia 3 aldiz txikiagoa zen ( $\Delta flbB; gpdA^p::socA::gfp$ ) anduiaren kasuan ( $1.12 \pm 0.33\text{cm}$ ), ( $\Delta flbB; socA::gfp$ ) anduiarekin alderatuz gero ( $3.23 \pm 0.06\text{cm}$ ) ( $p = 0,00000003$ ;  $n = 6$  lagin andui bakoitzeko; 5.6A irudia). Immunodetekzioz, *gpdA<sup>p</sup>* bidezko SocA::GFP-ren adierazpenak kimeraren kontzentrazioa nabarmenki handiarazten duela argi ikusi zen (5.6C irudia), SocA-ren gainadierazpenak hazkuntza inhibi zezakeela iradokiz. Ostera, hazkuntza medioan 0.65M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -ren

## 5. KAPITULUA:

gehikuntzak ez du SocA-ren kontzentrazioa handitzen zelulatan, bere adierazpena ez duela fosfatoaren presentziak induzitzen frogatuz (5.6D irudia).



**5.6. irudia: SocA-ren ezaugarritze funtzionala.** A)  $\Delta socA$ , SocA::GFP eta *gpdA*::SocA::GFP anduien fenotipoak, ezkerraldean  $\Delta flbB$  fondo genetikoan eta eskuinaldean genotipo basatipean. Anduiak MMA eta MMA + 0.65M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> baldintzetan hazi ziren 37°C-tan eta 72 orduz. Eskala barra = 2cm. B) Konidioen kuantifikazio grafika  $\Delta flbB$  fondo genetikoan anduien kasuan (espora/cm<sup>2</sup>; 48 ordura). Andui bakoitzak MMA medioan eta fosfatodun MMA medioan izandako konidio produkzioak alderatzen dira. Kasu orotan,  $p < 0.05$  balioa hartu da aldaketa esanguratsu bezala.  $\Delta flbB$  eta  $\Delta flbB, \Delta socA$  anduiak alderatuz fosfatodun medioan, espora produkzioa esanguratsuki jaisten da nulo bikoitzean;  $5.54 \times 10^6 \pm 0.22 \times 10^6$  espora/cm<sup>2</sup>-tik  $0.53 \times 10^6 \pm 0.19 \times 10^6$  espora/cm<sup>2</sup>-ra ( $p < 0.0001$ , aldaketa adierazgarria;  $n = 6$  andui bakoitzeko). C) Fondo genetiko basatian eta  $\Delta flbB$  fondoan SocA::HA<sub>3x</sub> eta *gpdA*::SocA::HA<sub>3x</sub> anduien immunodetekzioa

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

entseguak. *Coomassie*-a karga kontrol gisa erabili da. *gpdA<sup>P</sup>* promotore konstitutiboaz proteina-adierazpen maila nabarmenki handitzen da berezko promotoreaz kontrolatutakoarekin konparatuz. D) SocA::HA<sub>3x</sub> kimeraren (promotore natiboaren kontrolpean) immunodetekzio entseguak. Mizelioa 16 orduz MMA medio likidoan hazi ondoren, 0.65M fosfatodun MMA mediora transferitu zen eta 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 eta 240 minututara hartu eta erauzi ziren proteina laginak. Proteina kontrol gisa MFA-an, proteina erauzketarako ohiko kultura medioan, hazitako lagin bat tartekatu zen. Fosfatopean, esposizio denbora handitu arren, ez zen SocA proteinaren adierazpen-mailan aldaketa nabarmenik antzeman. *Coomassie*-arekin tindatutako gel-a karga kontrol bezala erakusten da. E) *gpdA<sup>P</sup>::SocA::GFP* anduiaren fluoreszentsia mikroskopia irudiak. DIC irudietan ikus daiteke *gpdA<sup>P</sup>* promotoreaz ohiko hazkuntza patroia aldatua dagoela, konidio batzuek sortutako ernamuintze hodian kopurua handiagoa delarik (gezi puntze adierazia). Fluoreszentsia irudietan SocA::GFP-ren lokalizazio nuklearra bereiz daiteke (geziez adierazia). Eskala barra = 5µm. F) Erreferentzia andui basati baten eta *gpdA<sup>P</sup>::SocA::HA<sub>3x</sub>* anduiaren ernamuintze patroien konparaketa kultura denbora desberdinetara. Anduiak MMA likidotan hazten jarri eta 6, 8, 10 eta 12 ordutara ernamuindutako eta ernamuindu gabeko konidio kopuruak zenbatu ziren. Argazkiez batera, andui eta kultura denbora bakoitzeko ernamuindutako konidioen portzentaiak jasotzen dira grafikoan. Promotore konstitutiboaz badirudi ernamuintzea atzeratu egiten dela; datu adierazgarri moduan, inokulaziotik 10 ordura, inokulatutako erreferentzia anduiaren konidioen %84.6 ± 7.0-ak ernamuindu zuen artean, *gpdA<sup>P</sup>::SocA*-ren esporen %32.7 ± 3.5-ak bakarrik ernamuindu zuen denbora berean. Bestalde, 12 orduko irudietan ikus daiteke *gpdA<sup>P</sup>* promotore konstitutiboaz ernamuintze hodiak ugariagoak direla erreferentziakoaren aldean. Eskala barra = 5µm.

SocA-ren karakterizazioaz jarraituz, *gpdA<sup>P</sup>*-z gainadierazitako SocA::GFP kimera nukleoetan pilatzen zela ikusi zen, ustezko transkripzioaren erregulatzaile funtzioarekin bat datorrena (berezko promotorea erabiltzean ezin izan zen fluoreszentsiarik detektatu) (geziak 5.6E irudian). Azterketa berean, aurrez aipatutako *gpdA<sup>P</sup>::SocA::GFP* edo *gpdA<sup>P</sup>::SocA::HA<sub>3x</sub>* anduiaren hazkuntza erradialaren inhibizioa, besteren artean, ernamuintze patroia modifikatu baten ondorioa zela ikusi zen, ohikoa dena baino hodi gehiago sortzen baitziren konidio bakoitzeko, eta hifak adarkatuago azaltzen ziren (5.6E eta 5.6F irudiak).

Azkenik, *socA*-ren momentu oroko gainadierazpenak ernamuintze prozesua atzeratzen ote zuen ala ez jakiteko, kultura denbora espezifikotan ernamuindutako konidioen portzentaia kuantifikatu zen, beti ere erreferentziako anduiarekiko alderatuz. Oro har, *gpdA<sup>P</sup>::socA*-z ernamuintzea atzeratuta zegoela ikusi zitekeen andui basatiarekiko (5.6F irudia). Honen adibide, hazten jarri eta 10 ordura, erreferentziako anduiaren esporen %84.6 ± 7.0 ernamuindu ziren artean, *gpdA<sup>P</sup>::SocA*-ren esporen %32.7 ± 3.5-k soilik aurkeztu zuten ernamuintze-hodiren bat

## 5. KAPITULUA:

---

(ikus 5.6F Irudiko grafika). Bestalde, SocA-ren adierazpen konstitutiboaz ikusi zen ernamuintze-hodi anizkoitz kasu gehiago jazotzen zirela ernamuindutako konidiako.

### 2.2.3. PmtC proteina-ren P282L mutazio puntualak eragin du FLIP166 fenotipoa.

#### 2.2.3A. FLIP166-ren genomaren sekuentziak.

Aurreko atalean identifikatutako *socA*-ren mutazio intronikoa FLIP166-ren fenotipoaren erantzule ez zela ikusirik, azken honen bilaketarekin jarraitu zen. Bigarren estrategia gisa, FLIP166 anduiaren genoma osoa sekuentziatzea erabaki zen. Honela, FLIP166 anduiaren DNA genomikoa STABVIDA enpresara (Caparica, Portugal) bidali zen sekuentziatu zezaten. Kontuan izan behar da FLIP166 anduia BD177 parentaletik eratorria dela; eta beraz, aurki zitezkeen mutazioak BD177 anduitik etor zitezkeela. Ondorioz, bildutako mutazio andanaren jatorria ziurtatzeko, gure DNA sekuentziak datuak eskura ziren RNA edo DNA sekuentziak datu desberdinekin konparatu ziren. Batetik, *ΔflbB* eta haren andui isogenikoaren RNA-seq datuak (Garzia *et al.*, 2013; Oiztegui-Arango *et al.*, 2015). Bigarrenik, Eduardo A. Espeso ikertzaileak utzitako *ΔsltA* eta haren erreferentzia anduiaren RNA-seq datuak (Picazo *et al.*, 2020). Eta azkenik, erreferentziako FGSCA4 anduiaren genomarekin. Konparaketarako, IGV *software*-a erabili zen. FLIP166 mutantean eta eremu exonikoetan aurkitzen ziren mutazioak soilik hartu ziren hautagaitzat.

Irizpide horiek jarraituz hainbat mutazio hautagai identifikatu zen. Horiek, 5.5. eranskinean biltzen dira IGV programan burututako sekuentzia konparaketarekin batera. Mutazioak mutagenesiaren ondorio zirela baieztatzeko, eta ez jatorrizko BD177 anduiarenak, hautagai ziren gene horietako batzuen sekuentziak PCR bidez amplifikatu egin ziren bai FLIP166-ren eta bai BD177-ren DNA genomikoetatik abiatuta. Ondoko gene hauetan aurkitu ziren mutazioak sekuentziatu ziren: 1) AN6835, 2) AN12172, 3) AN8615, 4) AN1459, 5) AN0560 6) AN7222 eta 7) AN8821. Kasu guztietan, AN6835-enean izan ezik, mutazioa FLIP166 anduiaren

soilik aurkitzen zela baieztatu zen. AN6835-en kasuan mutazioa FLIP166 nahiz BD177 anduietan aurkitzen zen eta, horregatik, baztertu egin zen.

Edonola ere, argi ikus daiteke mutagenesi prozeduraren ondorioz FLIP166 hautagaiak hainbat mutazio jasan zituela. Guztien artean FLIP fenotipoaren erantzule den mutazioa (edo mutazioak) identifikatu ahal izateko, genetika klasikoko teknikak baliatu ziren hautagai zerrenda txikiagotzeko. Aztergai den FLIP166 anduia, erreferentziatzko FGSCA68 eta FGSCA283 anduiez (*Fungal Genetics Stock Center*; (<http://www.fgsc.net/>) gurutzatu zen lehenik, mutazioa edo mutazioak zein kromosometan aurkitzen ziren identifikatzeko asmoz (Todd *et al.*, 2007a; Materiala eta Metodoak 7. atala). Andui hauek duten ezaugarri nagusia kromosoma bakoitzean markadore genetiko bana edukitzea da. FLIP166×FGSCA68 gurutzapen sexualetik lortutako askosporetatik, lehen belaunaldian, FLIP166 fenotipodun kolonia ugari isolatu zen eta selekzio-markatzaileen proba burutu zitzaien.

Probaren ostean, II., V. eta VII. kromosomengan jarri zen arreta. Izan ere, FLIP166 fenotipodun ondorengoek joera amankomuna aurkeztu zuten kromosoma horiei zegokien selekzio-plaketan: beti %80 baino gehiago hil edo hazten ziren. Bigarren kromosomari dagokionean, hautagaien %81 ziren sensibleak akriflabinarekiko. Bosgarren kromosomari dagokionean, %84 lisina gabeko medioan hazi ziren. Zazpigarren kromosomari dagokionean, azkenik, %81 azido nikotinko gabeko medioan hazi ziren. Portzentaia altuak izanda ere, errekonbinazio-tasa altuak iragartzen zituzten datuek. Ondorioz, proba errepikatzea erabaki zen baina, askosporetatik abiatu beharrean, diploideen haploidizazioz lortutako haploideez burutu zen. Alabaina, antzeko proportzioak lortu ziren eta ez zen bestelakorik ondorioztatu.

Datu guztiak aintzat harturik, eta bosgarren kromosoman mutazio exonikorik zeraman gene hautagairik ez zegoenez, II. eta VII. kromosomatako mutazio hautagaietara murriztu zen ikerketa esparrua (ikus berriz ere 5.5 eranskina). Bigarren kromosoman, AN12172 geneak, LCCL eremua daraman mintz-zeharkako proteina kodetzen duena, Ile94Asn ordezkapenari zegokion

## 5. KAPITULUA:

---

mutazioa zeraman. Zazpigarren kromosomari zegokionez bi hautagai genituen. Batetik, *AN12335/acdA* geneak, azil-CoA deshidrogenasa peroxisomiko bat kodetzen duena (Reiser *et al.*, 2010), Leu99Arg ordezkapenari zegokion mutazioa zuen. Bigarren eta azkenik, *AN1459/pmtC* geneak, proteinen O-manosiltransferasa bat kodetzen duena (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripiat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018), Pro282Leu ordezkapenari zegokion mutazioa zeraman.

### 2.2.3B. PmtC<sup>P282L</sup> mutazioaren identifikazioa FLIP166 fenotipoaren erantzule gisa.

Hiru gene hautagaietatik FLIP166 fenotipoa eragiten zuen mutazioa zeinetan zegoen jakiteko, aurre proba bat burutu zen *AN12172* eta *AN1459* hautagaiekin, kontrol gisa *AN0560* (VIII. chr) erabiliz. FLIP166 fenotipodun 7 ondorengoren DNA genomikotik abiatuta *AN12172*, *AN1459* eta *AN0560* eremuak amplifikatu ziren PCR-z. Eremu bakoitzari zegozkion zazpina amplifikazioak nahastu eta sekuentziatu egin ziren, nahaste bakoitzean mutazioak homozigotikoak ala heterozigotikoak ziren jakiteko (5.7A irudia). *AN12172* eta *AN0560* eremuen sekuentziazioetan bi piko gainjarri (berezko nukleotidoaren eta mutantearen aldaerarena) ikusi ziren. Beraz, FLIP166 fenotipoa eragiten zuten mutazioak horiek izateko aukera bazter zitekeen. *AN1459/pmtC*-ren kasuan soilik detektatu zen mutazioari zegokion piko homozigotikoa, hautagai nagusi bihurtu zelarik.

Edonola ere, aipatutako hiru hautagaien ezaugarritzeari ekin zitzaion. Aurrera jarraitzeko, hasiera batean behintzat, ontzat jo zen FLIP166 fenotipoa mutazio bakar baten ondorio izan zitekeela (*flbB*-ren delezioaz gain, noski). Honela, FLIP166 anduiaren protoplastoak, gene hautagai bakoitzaren forma basatiaz transformatzea erabaki zen, genearen zuzenketak konidiatzeko gaitasuna itzularazten zuen ala ez ikusteko. Transformazioetarako, *gfp* etiketadun eta *pyrG<sup>Afum</sup>* selekzio markatzaile-dun DNA *cassette*-ak eraiki ziren (*gene::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>*). *Cassette* bakoitzaren transformazioa modu independentean burutu zen. *pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* konstrukzioaren kasuan soilik lortu ziren fenotipoa leheneratu zuten transformanteak, 0.65M



## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

fosfatodun MMA medioan konidiatzeko gai zirenak, alegia (ikus 5.7B irudian transformante horietako baten fenotipoa). *Southern-blot* eta sekuentziazio teknikak erabiliz baieztatu zen *pmtC::gfp* konstrukzioak mutaziorik ez zuela eta *pmtC* locus-ean txertatu zela genomak. Beraz, *pmtC* genearen P282L ordezkapenari zegokion mutazioaren gain jarri zen arreta. *AN12172::gfp* eta *acdA::gfp* konstrukzioekin lortutako transformanteetan ez zen fenotipoaren errebertsiorik antzeman (5.7B irudia). Horregatik, *AN12172* eta *acdA* geneen mutazioek FLIP166 fenotipoa eragiteko aukera alboratu zen, nahiz eta ezin zen baztertu efektu gehigarriren batean parte har zezaketenik.

Aurrekoarekin batera, FLIP166-ren genomatik abiatuz hiru gene hautagaien *cassette* mutanteak eraiki ziren: *pmtC\*::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>*, *AN12172\*::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* eta *acdA\*::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* (asteriskoek aurretik deskribatutako gene bakoitzaren mutazioak adierazten ditu). Hiru konstrukzio horiez bai MAD1425 andui basatiaren bai *ΔflbB* anduiaren protoplastoak transformatu ziren. Berriz ere, konstrukzioen errekonbinaketa egokia *Southern-blot* teknikaren bidez baieztatu zen. *AN12172* eta *acdA*-ren konstrukzioek ez zuten fenotipo aldaketarik eragin, *pmtC*-renak ez bezala. Fondo basatian *PmtC<sup>P282L</sup>* mutazioak transformanteen konidiazio gaitasuna nahiz hazkuntza kaltetu zituen (ikus 5.7C irudia). Fosfatodun medioan, mutanteak konidiatzeko gaitasuna partzialki berreskuratzen zuen (ez da erakusten). Bestalde, P282L mutazioaren ondorioz, kolonien diametroa nabarmen txikiagoa zen, *PmtC::GFP* adierazten zuen anduiaren kolonia diametroa  $4.28 \pm 0.06\text{cm}$  izanik, *PmtC<sup>P282L</sup>::GFP* forma mutantea adierazten zuenarena  $1.96 \pm 0.08\text{cm}$ -ra jaitsi baitzen ( $n = 3$  lagin andui bakoitzarentzat;  $p = 0.000002$ ).



## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutatatuko geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

*ΔflbB* anduiaren protoplastoen transformazioaren kasuan, PmtC-ren forma mutantea adierazten zuen transformanteak fenotipo akonidiala erakutsi zuen 0.65M fosfatodun MMA medioan ere (5.7C irudia; bigarren lerroa). Beraz, (*ΔflbB*, PmtC<sup>P282L</sup>) anduiak FLIP (*fluffy in phosphate*) fenotipo garbia erakusten du. Emaizta hauek, FLIP166 anduiaren FLIP fenotipoa PmtC<sup>P282L</sup> mutazioaren ondorio dela iradokitzen zuten. Bestalde, eta WT fondoan ikusi bezala, *ΔflbB* fondo genetikoan ere mutazio horrek hazkuntza arazoak eragin zituen. FLIP166 anduiak alderatuz, diametro txikiagoa zuten *ΔflbB*, PmtC<sup>P282L</sup> transformanteek. Beraz, pentsa liteke FLIP166 anduiaren diren gainerako mutazioek edo mutazioaren batek hazkuntza egonkortzen dutela. Ikusitakoa bat letorke aurrez hainbat lanetan deskribatu izan den hazkuntza eta konidiazioaren kontrolean PmtC-k duen funtzioarekin (Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018).

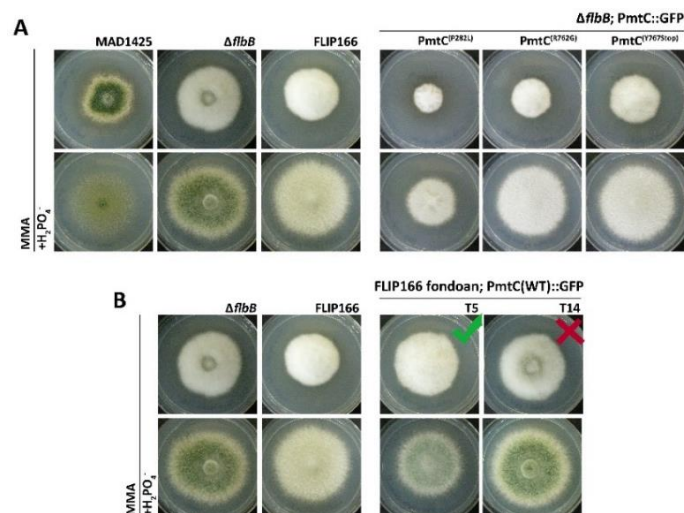
### 2.2.3C. PmtC-ren C-ertza funtsezko da konidiaziorako baina, ez hazkuntzarako.

BD177 anduiaren protoplastoak *pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* cassette-az transformatzean, fosfatotan akonidialak ziren baina hazkuntza arazorik aurkezten ez zuten bi transformante ere isolatu ziren (BD1351 eta BD1352) (5.8A irudia). Transformante horien DNA genomikotik abiatuta, *pmtC* eremua anplifikatu eta sekuentziatu zen. *pmtC*-ren sekuentziazioak erakutsi zuen transformante horietan P282L ordezkapenari zegokion mutazioarik ez zegoela. Aldiz, mutazio berriak antzeman ziren, bi kasuetan genearen 3' eremuan. BD1351 anduiaren mutazio puntual bat identifikatu zen, proteinaren 762. posizioan zegoen arginina glizinarekin ordezkatzeari eragiten zuena (PmtC-k 773 aminoazido ditu). BD1352-ren kasuan nukleotido baten gehikuntzaz irakurketa markoa aldatu eta Stop kodoi bat sartu zen 767. kodoian. Ondorioz, jatorrizko PmtC proteinaren azken 7 aminoazidoak galdu ziren. Bi anduietan, mutaziook PmtC-ren azken mintz-zeharreko (*transmembrane*; TM) eremuaren ondoren kokatzen dira (ikus 5.8A irudia) eta C-muturraren garrantzia begi-bistaratzen dute. Alabaina, PmtC<sup>P282L</sup> mutazioa ez bezala, ez dirudi hazkuntza kaltetzen denik. Edonola ere, kontuan izan behar da *pmtC*-ren mutazio hauek *ΔflbB*

## 5. KAPITULUA:

fondo genetikoan identifikatu direla eta *flbB*-ren delezioak *pmtC*-ren mutazio hauek hazkuntzan izan dezaketen efektua suprimitu lezaketela. Ondorioz, interesgarria litzateke fondo genetiko basatian mutazio hauek txertatu eta transformanteek zernolako hazkuntza eta konidiazio patroiak dituzten aztertzea.

*PmtC*-ren C-terminal ertza GFP-z etiketatzeak berak eremu honen garrantzia erakusten du. Izan ere, *PmtC*::GFP kimera adierazten duten zenbait transformanteetan (*AN12172*::GFP edo *AcdA*::GFP kimerak adierazten dituztenetan ez bezala) etiketatzeak fenotipoan eragin zezakeela ikusi zen (ikus 5.8B irudia). Ez dirudi, baina, proteinaren funtzionalitatea guztiz kaltetzen denik. FLIP166 fondo genetikoan *pmtC*::*gfp*::*pyrGA*<sup>fum</sup> cassette-arekin egindako transformazioetan isolatutako T14 errebertienteak *gfp* sekuentziaren hasieran mutazio bat zuela ikusi zen. *gfp*-ren lehen G nukleotidoaren delezioa ematen zen eta, ondorioz, irakurketa markoa aldatu eta *gfp*-ren itzulpen okerra ematen zen. Mutazioaren ondorioz, GFP etiketaren ordez, 27 aminoazidotako sekuentzia bat gehitzen zen *PmtC*-ren C-muturruan. Fenotipoari begiratzuz gero, transformante honek transformante egokiek baino gehiago konidiatzen zuen (Ikus T5 transformantea 5.8B irudian). Baliteke, T14 transformante honetan, etiketa laburragoa izaki, *PmtC*-ren funtzionalitatea gutxiago kaltetu eta, ondorioz, konidiazioaren errebertsioa hobea izatea. Emaitza honek, aurrekoekin batera, *PmtC*-ren karboxil ertza konidiaziorako (baina ez hazkuntzarako) funtsezko eremua dela iradokitzen dute.



**5.8. irudia: PmtC-ren karboxilo eremuaren garrantzia.** A) Erreferentziazko anduiekin batera (ezkerrean), *pmtC*-ren hainbat mutante akonidialen fenotipoa  $\Delta flbB$  fondo genetikoan (eskubian): 1.  $\Delta flbB$ , PmtC<sup>P282L</sup>::GFP; 2.  $\Delta flbB$ , PmtC<sup>R762G</sup>::GFP eta 3.  $\Delta flbB$ , PmtC<sup>Y767Stop</sup>::GFP, hurrenez hurren. Mutante guztiek *fluffy* fenotipoa zuten fosfatodun MMA medioan, baina C-terminaleko mutanteek (PmtC<sup>R762G</sup> eta PmtC<sup>Y767Stop</sup>) jatorrizko FLIP166-ren mutazioaz (P282L) alderatuz ez zuten hazkuntzan kalte nabarmenik erakutsi. Anduiak MMA eta MMA + 0.65M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> balditzapean hazi ziren, 37°C-tan eta 72 orduz. Petri plaken diametroa 5.5cm-ko da. B) FLIP166 anduiaren protoplastoak *pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* forma basatiaz transformatu zirenean hainbat kolonia isolatu ziren. T14 transformanteak gainerako transformanteek baina gehiago konidiatzen zuen. T14 transformanteak baina, *gfp* sekuentziaren hasieran duen mutazio baten ondorioz GFP etiketa osorik eraman beharrean 27 aminoazidotako kate peptidiko laburrago bat darama. Badirudi, beraz, C-muturrean etiketa txikiagoa izanik, PmtC-ren funtzionalitatea gutxiago kaltetu zela. Petri plakaren diametroa 5.5cm-ko da.

#### 2.2.3D. PmtC proteinen O-manosiltransferasaren azterketa bioinformatikoa.

PmtC proteinen O-manosiltransferasa entzima bat da. Proteinen O-manosilazioa, glikosilazio mota bat izaki, itzulpen ondorengo proteinen aldaketa bat da, zeinetan itu proteinaren serina edo treonina aminoazidoen hidroxilo taldeari manosa monosakarido molekula bat gehitzen zaion. O-manosiltransferasek itu proteinaren O-manosilazioa abiatzen dute erretikulu endoplasmaticoan, manosa molekula dolikil-P-manosa azukre emaletik hartuz eta glikosilatu nahi den proteinari transferituz (Lommel eta Strahl, 2009). Proteinaren glikosilazioak Golgi aparatuan jarraituko du ondoren, aurrez batutako manosari karbohidrato gehiago lotuz. PmtC PMT4 familiako proteinen O-manosiltransferasa da. *A. nidulans* ondoan beste bi proteinen O-manosiltransferasa (Pmt) gehiago ere ezagutzen dira, PmtA eta PmtB, PMT1 eta PMT2 familiakoak, hurrenez hurren (Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018). *pmt* gene horien banakako delezioak ez dira hilgarriak ondoarentzat, baina garapenean nahiz antifungikoekiko erresistentzian eragina dutela ikusi izan da (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018). *pmtC*-ren delezioak, hazkuntzaren murriztea eragiteaz gain, konidiazioa bera ere kaltetzen duela deskribatua izan da, tenperatura espezifikoetan eta egonkortzaile osmotikoekin konidiazioa neurri batean berreskuratzea lortzen bada ere (Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018). *A. nidulans*-en PmtA, PmtB eta PmtC-ren

## 5. KAPITULUA:

---

2169 sekuentzia ortologo fungikoez osatutako zuhaitz filogenetikoan (5.6. eranskina), hiru proteinak onddoen erreinuan oso kontserbatuak daudela ikusten da, hiruen funtzioek garrantzia handia dutela iradokiz.

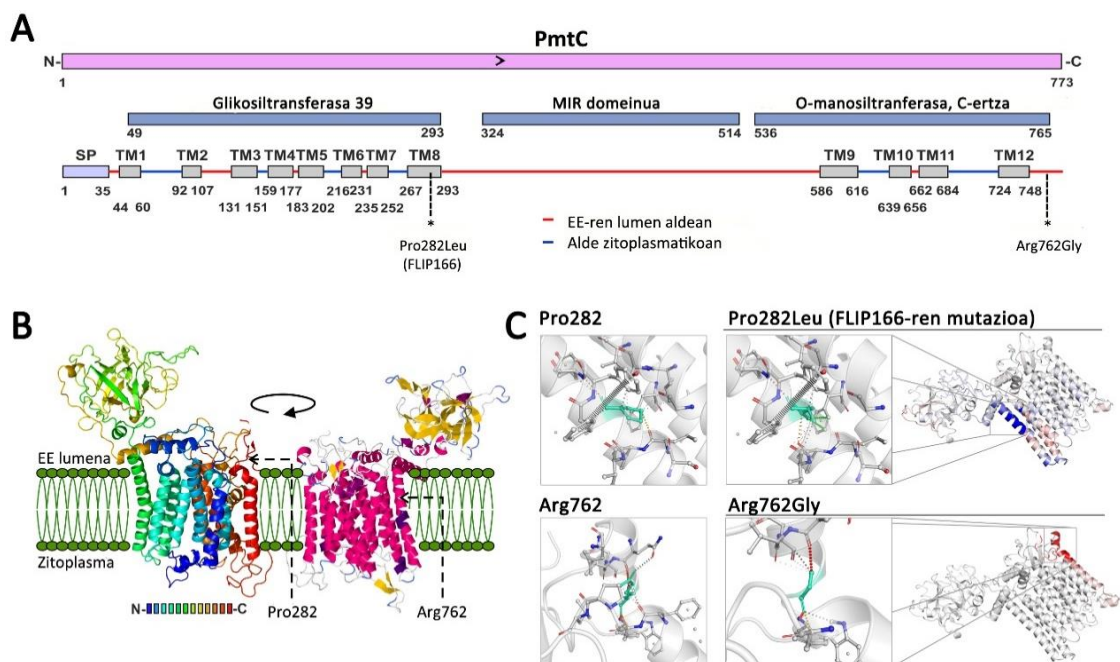
*pmtC* hiru exoi eta bi introiez osatuta dago, eta 773 aminoazidoko eta 88.2 kDa-eko proteina kodetzen du. InterPro plataformaz burutu zen *PmtC*-ren sekuentziaren azterketan hiru eremu funtzional bereizgarri identifikatu ziren (5.9A irudia). Lehen, glikosiltransferasa 39 eremua da (IPR003342), 49-293 aminoazidoen artean kokatua eta manosiltransferasa aktibitate bete lezakeena. Bigarrenik, MIR eremua (MIR izendapena eremua zeramaten proteinen izenen baturatik dator: proteinen Manosiltransferasa, 1,4,5-trifosfato Inositol errezeptorea eta Rianodina errezeptorea) (IPR016093) da, 324-514 aminoazidoen artean kokatua, hiru MIR motibo errepikatuz osatzen dena eta ligandoen transferentzia funtzioa eduki lezakeena. Azkenik, O-manosiltransferasa eremua dago C-muturrean (IPR032421), 536 eta 765. aminoazidoen artean kokatua eta lau TM eremu izan ditzakeena.

SwissModel ([SWISS-MODEL Interactive Workspace \(expasy.org\)](http://www.expasy.org/SWISS-MODEL); (Waterhouse *et al.*, 2018)) eta Phyre2 ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/); (Kelley *et al.*, 2015)) programez *PmtC* proteinaren egitura tertziarioa aurrean nahi izan zen. Aurreikuspen bioinformatikoek ustezko glikosiltransferasa domeinuan zortzi TM eremu proposatu zituzten, C-terminalean aurreikusi ziren beste lauekin batera (5.9A irudia). Hain justu, FLIP166 hautagaien identifikatutako P282L mutazioa glikosiltransferasa domeinuaren barruan 8. TM eremuan legoke. *PmtC*-ren hiru dimentsiotako egituraren aurreikuspenean (%90-tik goragoko konfidantza-mailaz eraikitako eredu) TM eremu horiek  $\alpha$ -helize itxura dute eta  $\alpha$ -estruktura bat osatuko lukete, erretikulu endoplasmaticoaren (EE) mintza zeharkatuko lukeena. MIR domeinua aldiz,  $\beta$ -upel forma luke eta EE-aren lumen aldean egongo litzateke (5.9B irudia). DynaMut (<http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut/>; (Rodrigues *et al.*, 2018)) programaren arabera, leuzina baten sarrerak 282. posizioko prolinaren orde zortzigarren TM helizearen zurruntasuna

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutatatuko geneen identifikazio eta ezaugarritzea

handituko luke, ustez L aminoazido honek 248. posizioan eta 7. TM eremuan dagoen fenilalaninaz elkarrekintza hidrofobikoa ezarriko bailuke (5.9C irudia).

Gerora identifikatu zen R762G mutantean, aminoazido aldaketa C-terminalean aurkitzen da, azken TM eremuaren ondoren. DynaMut plataformaren arabera, mutazioak azken TM-a desoreka lezake, 5.9C irudian gorri ikus daitekeen moduan.



**5.9. irudia: PmtC-ren azterketa bioinformatikoa.** A) PmtC-ren eremu funtzionalen aurreikuspena InterPro eta Phyre2 plataforma bioinformatikoen arabera. Hiru eremu bereizi ziren: 1. glikosiltransferasa aktibitatea eduki lezakeen eremua; 2. MIR eremua eta 3. O-manosiltransferasa eremua C-muturrean. Bestalde, 12 TM eremu aurreikusi ziren, eta marren koloreek EE-aren lumen alderantzko (gorria) edo zitoplasmarantzko (urdina) orientazioa adierazten dute. Azkenik, P282L eta R762G mutazioen posizioa erakusten da. B) PmtC proteinaren egitura hirudimentsionala eta EE-aren mintzan izan lezakeen kokagunea adierazten dira, beti ere Phyre2 eta SWISS-MODEL zerbitzariak eraikitako PDB (Protein Data Bank) egituraren arabera. Ezkerraldeko irudian urdinetik gorrirako koloreek proteinaren sekuentziaren posizioa adierazten digute eta eskuinaldekoan egitura sekundarioen eremuak bereizi nahi izan dira (arroxaz  $\alpha$ -helizeak eta horiz  $\beta$ -egiturak). C) DynaMut webgunearen arabera, P282L eta R762G mutazioek proteinaren barruko elkarrekintza interatomikoetan eragingo litzuzketen aldaketak ikus daitezke. P282A-ren kasuan, TM8-ren zurruntasuna handiagotzeaz egonkortu egingo litzateke eremu hori (kolore urdinez adierazia eskuineko irudian). Aldiz, R762G aminoazido aldaketak, proteinaren C-terminal ertzaren egonkortasuna jaitsiko luke (kolore gorria eskuineko irudian).

### 2.2.3E. P282L mutazioak ez du aldatzen PmtC-ren lokalizazio subzelularra.

Eredu bioinformatikoen proposatutako TM eremu ugariak, PmtC-k mintzera lotuta behar lukeela iradokitzen dute. Bestalde, PmtC-k proteinen O-manosiltransferasa gisa jokatu lukeen funtzioagatik, EE-aren mintzera lotuta egon daitekeela pentsa liteke. Fluoreszentzia maila txikiekin lan egin arren, PmtC-ren ustezko lokalizazio subzelularra aztertu ahal izan zen lan honetan sortu ziren PmtC::GFP anduietan. (Markina-Iñárraegui *et al.*, 2013; Bravo-Plaza *et al.*, 2019) lanetan, EE-ko Sec63 eta Sec12 proteinen lokalizazio subzelularra deskribatzean, nukleo estaldurak izan zitezkeenak bereizi ziren, bai eta harizpi eta *patch*-z osatutako egitura sarekatuak ere. Hain zuzen, ikusitako patroien horiek bat letozke EE nuklearrarekin eta periferikoarekin, hurrenez hurren. Fondo basatian nahiz  $\Delta flbB$  fondoan, PmtC::GFP-ren fluoreszentzia bat zetorren arestian deskribatutako lokalizazio horiekin (5.10A irudia), ziurrenik EE-aren posizioa adieraziz.

PmtC-ren ustezko EE-ko lokalizazio horretan sakontzeko, eta aurrez (Markina-Iñárraegui *et al.*, 2013) lanean bertan Sec63-rekin egin zuten bezala, fluoreszentzia mikroskopiarako hazkuntza medioan 8 mM DTT gehitu ziren erretikuluaren estresa eta honen UPR (*unfolded protein response*) erantzuna eragiteko. PmtC EE-n kokatuko balitz, proteinaren deslokalizazioa ikustea espero zitekeen DTT-a gehitu ondoren. DTT konposatua kultura mediora gehitu eta ordubetez PmtC-ren fluoreszentiaren bilakaera aztertu zen, 5.10. irudiaren B atalean ikus daitekeen irudi sekuentzian erakusten den bezala. Hasiera batean, PmtC-z ikusten ziren egitura sarekatuagoetatik, puntu edo *patch* bakartu eta handiagoak begiztatzera pasa zen, PmtC-ren lokalizazio patroien berri bat eman zela ondorioztatu zelarik. Hifen morfologia bera ere DTT-arekiko esposizioarekin aldatu egin zen, hazkuntza eten eta hifen puntak puztu egin zirelarik. Efektu hau ikustean, ontzat eman zen DTT-aren eragina.

Bestalde, DTT-a mediotik kentzeko egindako garbiketen ondoren, PmtC-k jatorrizko fluoreszentzia patroia eta lokalizazioa berreskuratu zituen. DTT-a ezabatzeaz batera, hifek

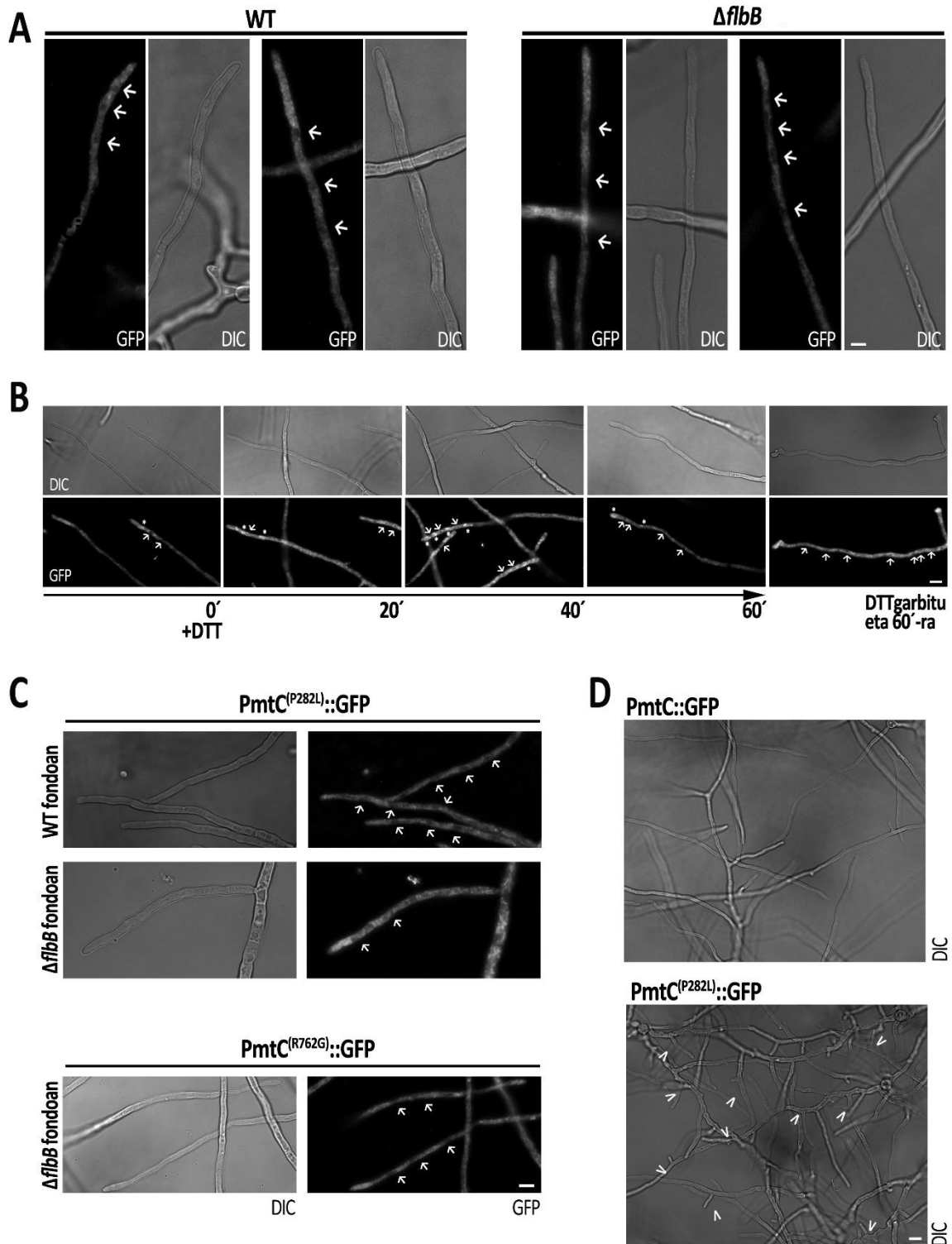


## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

hazteari ekin zioten berriz; alabaina, polarizazio puntu berri bat ezartzean, jatorrizko norabidetik desbideratuta jarraitu zuten hazten eta 5.10B irudian ageri diren egitura ezohikoak (punta bikoitzak balira bezala) ikusi ziren.

Azkenik,  $\text{PmtC}^{\text{P282L}}::\text{GFP}$  edo  $\text{PmtC}^{\text{R762G}}::\text{GFP}$  kimera mutanteen kasuan, fondo basatian nahiz  $\Delta\text{flbB}$  fondoan, ez zen aurretik deskribatutako lokalizazioan aldaketarik antzeman (5.10C irudia). Beraz, badirudi bai 8. TM eremua baita C-terminal ertza ere beharrezkoak direla  $\text{PmtC}$  proteinaren funtzionamendu egokirako, baina ez honen lokalizaziorako. Bestalde  $\text{PmtC}^{\text{P282L}}::\text{GFP}$  kimera adierazten duen anduiak ohiko hazkuntza patroiarekiko adarkatze nabarmena erakutsi zuen, adar ugari ikusten direlarik (5.10D irudia). Adarkatze portaera hori bat dator aurretiko lanetan  $\text{pmtC}$ -ren nuluaz deskribatu denarekin (Kriangkripiat eta Momany, 2009).



**5.10. irudia: PmtC-ren lokalizazio subzelularra.** A) PmtC-ren lokalizazio subzelularra fondo genetikodun eta  $\Delta flbB$  fondo genetikodun hifetan. (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2013) lanean oinarrituz, nukleo estaldurak izan litezkeenak begiztatu ziren harizpi itxurako sare modukoan, baita hifen punta aldean akumulazio edo *patch*-ak ere. EE-aren lokalizazioaz bat letorke aztertutako fluoreszentsia egiturak, honetan gehiago sakondu ez zen arren, esaterako, Sec63 edo Sec12 markatzaile bezala erabiliz. Gezien bidez ustezko nukleo estaldurak adierazi dira. Eskala barra= 5 $\mu$ m. B) PmtC-ren lokalizazioa hifatan hazkuntza mediora 8 mM DTT gehitu (EE-ren estres eragilea; (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2013)) eta 0, 20, 40 eta 60 minutura. PmtC-ren deslokazioa jazo zen, eta hifen puntak ere puztu egiten zirela ikusi

zen, azken hau bat zetorrelarik UPR erantzun batekin. Azken irudian DTT mediotik garbitu eta ordubetera jasotako mikroskopia argazkia erakusten da. Hifek berriro ekin zioten hazkuntzari, zenbait kasutan polarizazio puntu berrietatik abiatuz eta, ondorioz, hifen puntatan egitura bitxiak erakutsiz (punta bikotz modukoak). Eskala barra= 5µm. C) PmtC<sup>P282L</sup>::GFP (fondo genetiko basati nahiz *ΔflbB* fondo genetikoan) eta PmtC<sup>R762G</sup>::GFP (*ΔflbB* fondoan) kimerak mutanteen lokalizazioa. PmtC::GFP forma basatiaren fluoreszentsia patroia parekoa errepikatzen zen eta ez zirudien mutazioen ondorioz PmtC-ren deslokalizaziorik ematen zenik. Eskala barra= 5µm. D) PmtC::GFP eta PmtC<sup>P282L</sup>::GFP kimerak adierazten dituzten anduie hifen hazkuntza patroia. FLIP166 fenotipoa eragiten duen mutazioa dela eta, hifak gehiago adarkatzen zirela antzeman zen. Gezi-buruez adarkatze eremuak adierazten dira. Eskala barra= 5µm.

### **3. Eztabaida.**

Garapen asexuala ingurune berrietara zabaltzeko onddoen dispersio sistema nagusia izaki, ezin uka konidiazioa aurrera eramateko urrats eta parte-hartzaileen garrantzia. Zuzenean edo zeharka, hainbat dira konidiazioa erregulatzen duten geneak, baina oraindik kontrol mekanismo genetiko eta molekularren ezagutza sakona urruti dagoela kontsidera daiteke. Berdin gertatzen da konidiazioak bestelako prozesu zelularrez dituen loturak ezagutzeko ere, besteak beste hazkuntza polarra, garapen sexuala edo estres baldintzei aurre egiteko mekanismoekin. Lan honen abiaburuko helburua, estres baldintza jakinetan konidiazioaren kontrolean zuzenean edo zeharka parte hartzen duten gene berriak identifikatzea izan da, kontrol mekanismoen irudi orokor horretako elementu berriak ezagutzeko asmoz. *ΔflbB* anduia aukeratu da parental bezala, UDA bidea kaltetua duelako baina fosfato kontzentrazio handitan (>0.5M) konidiatu egiten duelako. Era horretan, ustez, fosfato estrespean konidiazioa posible egingo luketen elementuak identifikatu nahi izan dira. Doktorego tesi honetan burututako mutagenesi prozedurari esker, baldintza hauetan akonidialak ziren *ΔflbB* mutanteen bilduma zabala osatu da. Hautagaien fenotipo aniztasunak konidiazioaren kontrolean parte har lezaketzen hainbat elementu egon litekeela erakusten du, eta elementu horietako batzuk hazkuntza bezalako prozesuen kontrolean ere parte har lezaketela. Mutante bilduma osatzeaz eta sailkatzeaz gain, FLIP166 fenotipoaren atzean egon daitezkeen geneen identifikaziorako bi

## 5. KAPITULUA:

---

estrategia jarraitu ziren, eta horiei esker *AN8501/socA* eta *An1459/pmtC* hautagaiekin egin zen topo. Egun, bildumatik, FLIP57 eta FLIP76 (hauek ere bildumako 2. talde fenotipikokoak, *fluffy* fenotipo nabarmena izaki bestelako ezaugarriak gabekoak) mutanteen genomak ere sekuentziatu dira, eta bakoitzaren fenotipoa eragin dezaketen mutazioak zeintzuk izan daitezkeen identifikatu da. Lan honen jarraipenak zehaztu beharko du zeintzuk diren mutazio horiek eta dagokien geneek konidiazioan duten edota UDA/CDP bide genetikoekin duten zuzeneko edo zeharkako harremana.

Genoteka autoerreplikakorraz eginiko transformazioaz *AN8501/socA* identifikatu zen FLIP166-ren fenotipo akonidialaren supresore multikopia moduan. Eskura ziren RNA-seq irakurketei begiratuz (Garzia *et al.*, 2013; Oiartzabal-Arano *et al.*, 2015) konidiazioa abiatu eta bost ordura ez zen *socA*-ren adierazpen aldaketa esanguratsurik antzeman. UDA bideko erregulatzailerak jakin batzuk adierazpen maximo bat izan ohi dute une horretan, *brlA*-ren adierazpenaren igoeraren hasierarekin kointzidituz, hain justu. Bestalde, *socA*-ren mutante nuluak MMA medioan erakutsitako fenotipo konidiantek ere, SocA konidiazioaren kontrolarekin zuzenean harremanduta egon zitekeela baztertzeraz eraman gintuen. Alabaina, fosfato medioan  $\Delta socA$ ,  $\Delta flbB$  nulo bikoitzak, *flbB* nulu sinpleak ez bezala, konidiatzeko ezintasun nabaria aurkezten du. Aldiz, SocA-ren momentu oroko gainadierazpenak onddoaren hazkuntza mugatzen du, kolonien diametroa esanguratsuki txikiagoa izanik. SocA proteina maila desegokiak hazkuntza polarizatuan izan dezakeen eragin negatiboa ikusirik, FlbB-ren gabeziaz batera SocA-ren galerak efektu gehiagarria ekar lezakeela pentsa liteke. Alegia, *socA-k* konidiazioan zuzenean eragin beharrean, *flbB* nuluan SocA konidiazioaren kontrolarekin zerikusia izatera pasako litzateke, bide genetiko espezifikoak berrantolatzearen ondorioz akaso. Era honetako hipotesia proposatu zen duela gutxi argitaratutako lanean (Dai, 2019).

Era berean, FLIP166 mutantearen protoplastoak pRG3-AMA-NotI genotekaz transformatzean, *socA* genea zeraman plasmidoa hartutako transformanteak fenotipoa

## Fosfato ioiek eragindako estrespean konidiatzen ez duten mutanteen isolatzea eta mutaturako geneen identifikazio eta ezaugarritzea

---

leheneratu eta 0.65M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-dun MMA medioan konidiatu egiten zuen, SocA-ren kontzentrazioa handitzearen ondorio zurrenik. Alabaina, *socA*-ren sekuentziazio eta azterketak baztertu egin zuten *socA*-ren mutazioak FLIP166 fenotipoa eragitea, eta beraz proteinaren gainadierazpenak FLIP166 fenotipoa suprimitu zezakeela ondorioztatu zen, toxiko izatera heldu gabe. Genotekaz transformatzean, *flbB*-k berak ere FLIP166-ren FLIP fenotipoa leheneratzen zuela ikusi zen. Egokiagoa zatekeen, beraz,  $\Delta flbB$  anduiaren genomarekin eraikitako genoteka bat erabiltzea, baina, momentu horretan, laborategian eskura zeuden tresnak erabili ziren. Edozein kasutan, FlbB bera FLIP166 fenotipoaren supresore bezala identifikatzeak, FLIP mutante horren fenotipoa bi efekturen batura zela ikusteko aukera eman zuen.

Bestalde, datu baseetan jasotako *socA*-ren anotazio okerra zuzentzean, iragarpen bioinformatikoen SocA Zn<sup>2</sup>-Cys<sub>6</sub> motako TF bat dela iragarri zuten. Honela bada, SocA estres baldintza jakinen aurrean erregulatuak transkripzional gisa jardun daitezkeela pentsa liteke. Kasurako, SocA fosfatoak eragindako estresarekiko espezifiko den jakitearren egin zen probetan ez zen adierazpen aldaketarik antzeman NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-arekiko esposizio denbora desberdinetan. Beraz, bere funtzioa fosfatoarekiko espezifiko izan zitekeela baztertu zen. Edozela ere, SocA-ren kontzentrazioa zelulatan zaindu beharreko faktore bat da hazkuntza eta garapen patroi egokiak eman daitezen.

FLIP166 fenotipoa eragiten zuen mutazioa identifikatzeko bigarren estrategia bezala, haren genomaren sekuentziazioa erabili zen. Honi esker, aurretik funtzionalki ezaugarritua zegoen PmtC proteinen O-manosiltransferasa identifikatu zen (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018). Lortutako emaitzek baieztatu zuten PmtC-ren P282L mutazioak eragiten zuela FLIP166-ren “*fluffy in phosphate*” fenotipoa. Gerora identifikatu ziren R762G eta Y767Stop forma mutanteek ere fenotipo akonidialak eragiten zituzten 0.65M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-dun MMA medioan, beti ere  $\Delta flbB$  fondo genetikoan. Honek, PmtC-k konidiazioan duen garrantzia berretsi zuen (Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018), eta haren

## 5. KAPITULUA:

---

lokalizazio subzelularren eta aipaturako mutazioek lokalizazio horretan izan dezaketen eraginaren azterketari bidea zabaldu zion. Proteinen O-manosiltransferasen funtzioa proteinen eraldaketa izanik, EE-an aurkitu ohi dira (Girrbach *et al.*, 2000). (Markina-Iñarrairaegui *et al.*, 2013; Bravo-Plaza *et al.*, 2019) lanetan, Sec63 eta Sec12 proteinen EE-ko lokalizazioaren deskribapenari jarraiki, PmtC-k erakutsi zuen lokalizazio patroiatatik, bera ere EE-n aurki daitekeela pentsa liteke. PmtC-ren P282L mutazioari dagokionez (baita R762G mutazioa ere), ez dirudi proteinaren lokalizazioa aldarazten duenik. Beraz, aminoazido aldaketak, lokalizazio galera baino, proteina-O-manosiltransferasa aktibitatea kaltetu lezake eta funtzionalitate galera hori izango litzateke FLIP166 fenotipoaren iturburu.

Edozein kasutan, PmtC-ren P282L mutazioa FLIP166 anduiaren FLIP fenotipoaren erantzule gisa identifikatu bada ere, ezin daiteke baieztatu SOSCon bide genetiko hipotetiko baten partaide denik, ezta UDA bidearen parte denik ere edota FlbB-rekin harreman funtzional zuzena duenik. Izan ere, PmtC-ren mutazioak FlbB-ren glikosilazio hipotetiko bat kaltetuko balu, *flbB*-ren nuluaren fenotipo parekoa esperoko litzateke, edo ez behintzat bien arteko efektu gehigarri bat. Beste aukera bat litzateke PmtC-ren mutazioak UDA edo CDP bideetan zeharka eragitea, konidiazioa aktibatu edo burutzeko beharrezko aldaketak kontrolatzen dituen partaide baten inaktibitatea eraginda. Hain zuzen, fondo basatian PmtC<sup>P282L</sup> mutanteak ez du ohiko konidiazio patroia aurkeztu nahiz eta *flbB*<sup>+</sup> izan. Pentsa liteke konidiazioa burutzeko egitura espezifikoaren garapenean huts egiteren batek eragitea fenotipo hau. Aurrez ere deskribatu izan da *pmtC*-ren delezioak konidiazioan duen efektua, bai eta onddoaren hazkuntzan duen eragina ere (Kriangkripipat eta Momany, 2009; Le *et al.*, 2018). PmtC<sup>P282L</sup> mutanteak ere ohiko kolonia diametroa baina txikiagoa aurkeztu zuen eta begi bistakoa da mutazioak onddoaren hazkuntzan duen galera. Edonola, lan honetan ez da mikroskopikoki aztertu mutazio honek konidioforoen sintesiaren indukzioan edo hauen morfologian eduki lezakeen eragina. Bestalde, aurrez argitaratutako lanetan egonkortzaile osmotikoek (Goto *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2018)  $\Delta pmtC$ -ren efektua gutxiagotzen zutela azaldu bezala, baliteke fosfatoak ere gure mutantearen hazkuntza

apur bat egonkortu izana. Horrelako fenotipoak ikusi dira ere osaturako bildumako zenbait FLIP mutanteetan. Bada, PmtC mutatzeak eragindako onddoaren hazkuntza eta garapen arazoak, *flbB*-ren gabeziak batera, konidiazio ezintasuna ekarri lezake fenotipo gehigarri moduan.

Edonola ere, azterketa gehiago behar da PmtC-k konidiazioa kontrolatzen duten bide genetiko eta molekularretan duen kokapena eta funtzio zehatza ezagutu ahal izateko. Izan ere, lan honetan eta aurretik deskribatutako emaitzekin ezin baitaiteke esan PmtC-k zuzeneko parte hartzea duen ala ez, esaterako, konidiazioaren erregulatuaren baten glikosilazioaren ardura izanik batetik, edo hazkuntzan parte hartzen duen eta garapenean zeharkako funtzioa duen proteinaren baten modifikazioa burutuz, bestetik. Aurreko lanetan, PmtC-k (eta PmtA-k) estres seinalizazio eta transdukzioan diharduen mintzeko WscA/AN5660 proteina eraldatzen duela deskribatu da (Goto *et al.*, 2009; Kriangkripipat eta Momany, 2009). Aldi berean, *wscA*-ren delezioak *A. nidulans* kolonien hazkuntza diametroa nabarmenki murrizten zuela deskribatu zen (Futagami *et al.*, 2011). Ondorioz, interesgarria litzateke PmtC-k itzulpenaren ondoren eraldatzen dituen proteinak identifikatzea eta horiek konidiazioaz izan lezaketen lotura ikertzea. Horretarako, PmtC-ren interaktoreak bilatzea aproposa litzateke etorkizun batean.





## **6. KAPITULUA: Eztabaida orokorra**



## EZTABAIDA OROKORRA.

Doktorego tesi lan honetan, *A. nidulans* harizpi itxurako onddoaren garapen asexualaren indukzioan diharduten hainbat gene identifikatu eta/edo funtzionalki aztertu da. Garapen asexualaren oinarri diren konidioforoaren eraketa CDP bideak kontrolatzen badu ere, korrontean gora aurkitzen diren seinalizazio bideak ezinbestekoak dira prozesua genetikoki, eta ondoren, morfologikoki, eragiteko. Eragile hauek ugariak dira, funtzio anitzekoak, eta espazialki eta denboran zehar lokalizazio desberdinak erakusten dituzte. Inguruneko baldintzak hauteman eta horien transdukzioa helburu duten bide genetikoen konplexutasuna eta garrantzia ukazina da, beraz. Baina, besteen artean, lan honek azaleratzen duen muga bat oraindik sare konplexu horietako elementu guztiak ez direla ezagutzen da. Eta ezagutzen direnen arteko harreman genetikoki eta molekularretan luze dago sakontzeko oraindik ere, bai eta eragile horiek hazkuntza edo garapen sexuala kontrolatzen dituzten beste erregulatzailerekin nola koordinatzen diren jakiteko ere. Doktorego tesi honetan landu diren bi lan lerroek UDA bideko eragile espezifikoaren arteko harreman molekularrean sakondu nahi izan dute, batetik, eta seinalizazio lanetan diharduten faktore berriak identifikatu, bestetik. Lehenengoan, FlbB TF-aren dinamika eta funtzioa kontrolatzen duten elementu berriak identifikatu dira. Bigarreanean, SocA ustezko TF-aren lehen ezaugarritze funtzional bat burutu da, eta PmtC-ren aktibitatea oztopatzen duten mutazio berriak aztertu.

### **1. FlbB TF-aren dinamika eta jardute mekanismoa *brlA*-ren erregulaziorako.**

#### 1.1. FlbB-ren puntaranzko garraio FlbE-rekin batera.

(Herrero-Garcia *et al.*, 2015) lanaren arabera, FlbB-k ezinbestekoa du puntatik igarotzea jarraian TF gisa aktiboa izateko (*brlA*-ren indukzioari dagokionean), eta beraz garraio akropetalak

## 6. KAPITULUA:

---

berebiziko garrantzia hartzen du. FlbB-ren puntaranzko garraioa eta punta lokalizazioa baina, ezin dira ulertu FlbE-ren bitartekaritzarik gabe. Hori dela eta, ikerketa ugari FlbB nahiz FlbE proteinen eremu funtzionalen azterketan, eta horiek bi proteinen arteko elkarrekintzan eta lokalizazioan nola diharduten aztertzen oinarritu dira (Cortese *et al.*, 2011; Herrero-Garcia *et al.*, 2015; Otamendi *et al.*, 2019).

### 1.1.1. FlbB eta FlbE konplexuaren dinamika puntaranzko bidean.

Esan bezala FlbB eta FlbE-ren garraio akropetala giltzarria da ondorengo FlbB-ren funtzioa gauzatzeko. Ondorioz, konplexu proteikoaren dinamika arretaz azertu izan da. FlbB/E konplexua puntara ailegatzeko MT-en zitoeskeletoa ez dela ezinbestekoa deskribatu zuten (Garzia *et al.*, 2009), benomiloaz MT harizpiak ezegonkortuta ere FlbB eta FlbE-k punta lokalizazioari eutsi baitzioten. Artean aktina harizpiak ezinbestekoak dira garraio akropetal honetan (Garzia *et al.*, 2009), eta badirudi MyoE proteina motorea dela horietan zehar konplexua gune subapikaletik apizera eramateko arduraduna (Otamendi *et al.*, 2019b). Bestalde, FlbE-ren eremu funtzionalen azterketek seinale peptidoa izan zitekeen eremuaren garrantzia berretsi zuten. Eremu honetako W11A mutazioak bi proteinen punta lokalizazioaren galera eta fenotipo akonidiala eragin zituen (Otamendi *et al.*, 2019b). FlbE-ren eremu hau peptido seinale bat balitz, proteina hau (eta harekin batera FlbB) EE-ra zuzentzen dela pentsa liteke, eta jarraiki FlbB/E konplexua garraio-besikulen trafikoaz apizera bidera daitekeela.

Besikula bidezko garraioaren aukerari helduta, doktorego tesi honetan, FlbB-ren ustezko interaktoreak identifikatu ahal izateko, *in vivo pull-down* estrategia bat garatu da. Etorkizunean, frakzio erretentuen masa espektrometriak FlbB-k edo/eta FlbE-k erretentitutako proteinak identifikatzea posible egingo luke, eta, bestek beste, jariatzen-besikulen trafikoaren kontrolean parte hartzen duen proteinarik tartean baden aztertuko litzateke. Hain zuzen, ideia honekin (bigarren kapituluko 2.2.2. atalean) proposatu den *pull-down* esperimentuan, FlbE-ren aldaera

basatiari tiraka interaktoreak erretentitzez gain, ustezko seinale peptidoaren FlbE(W11A) mutanteaz ere errepikatuko litzateke prozedura. Honela, bi frakzio erretentituak alderatuz, mutantearen kasuan besikulen garraioaz zerikusia luketen proteinak erretentitzeari utziko liokeen ikusi ahalko litzateke. Doktorego tesi honetan burutu den *pull-down* eta ondorengo *western-blot*-ean, FlbE(W11A) eta FlbB-ren erretentzio seinalearen txikiagotzeaz, ustezko interakzio zuzena kalte litekeela pentsa liteke. Baina posible da FlbB-FlbE arteko konplexu horretan bitartekari gehiago aurkitzea eta mutazioaren ondorioz konplexuren egonkortasuna kaltetu izana, konplexua bera garraiorako ere ezinduz. Etorkizunean, *pull-down* eta masa espektrometria entsegu akoplatuak konplexuaren partaide posible gehiago nahiz interaktoreak identifikatzeko baliagarria izan litezke eta ikerketa-lerro berriak ireki.

Hipotesi honekin kontraesanean baina, FlbB-ren garraio akropetala MT-en baitakoa ez dela dirudi. Sarreran aipatu bezala, jariatzen besikulen garraioa subapizerantz MT-tan zehar burutzen da eta hau ez letorke bat FlbB/E-rekin ikusitakoarekin (Garzia *et al.*, 2009). Alabaina, kontuan izan behar da hifen hazkuntza bera ez dela guztiz inhibitzen MT-ak kaltetutakoan, abiadura nabarmen jaitsi eta hazkuntza noranzkoan akatsak antzematen badira ere (Horio eta Oakley, 2004). Aktina harizpien kasuan ez bezala, MT-en funtzio egokia galaraztean hifak hazten jarraitzen dute. Puntarekiko Golgi aparatuen gertutasuna dela eta (Markina-Iñarrairegui *et al.*, 2013; Pinar *et al.*, 2013), MT-en menpe ez dagoen besikulen mugimendu *brownianoaz*, hauek aktina harizpietaraino iristeko aukera egon litekeela iradoki zuten (Horio eta Oakley, 2004). Ondorioz, MT-en baitako distantzia luzeetarako garraioa ez litzateke hain garrantzitsua izango, eta aktina zitoeskeletoa nahikoa litzateke hazkuntza polarizatua burutzeko (Takeshita *et al.*, 2014). Aztertu beharreko aukera litzateke ea FlbB/E-ren kasua ere hori izan litekeen. Horretarako, bai eta jariatzen besikulen bitartekaritza aztertzeko, aukera aproposa izan liteke A Brefeldina konposatuaren erabilera. Izan ere, konposatu honek barne-mintz sistemaren trafikoa kaltetzen du, artean COPI besikulen eraketa inhibituz (Bourett eta Howard, 1996; Breakspear *et al.*, 2007). Hain justu, FlbB-ri tiraka egindako aurretiazko *pull-down*/masa espektrometria

## 6. KAPITULUA:

---

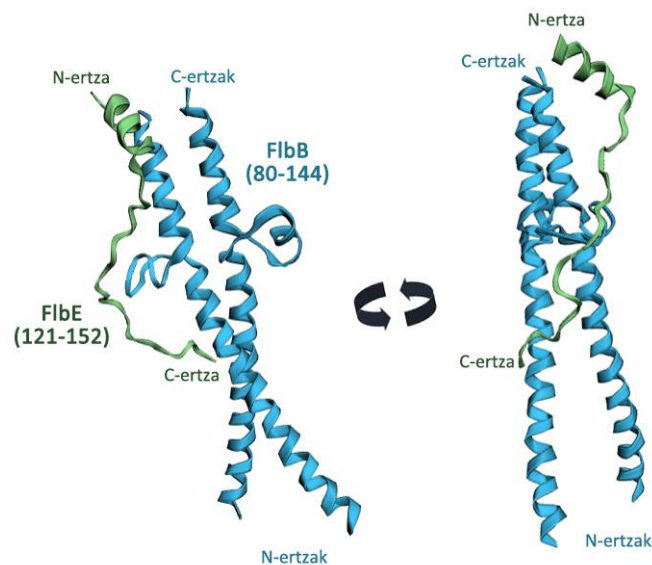
azterketa batean, COP besikulen estalduren osaeran diharduten CopA (Breakspear *et al.*, 2007) eta SarA (Hernández-González *et al.*, 2015) faktoreak identifikatu ziren. A Brefeldinaren eraginpean FlbB/E-ren lokalizazioak *in vivo* mikroskopiaz aztertu beharko lirateke, ea EE eta Golgi makineria kaltetzeaz punta lokalizazioa mantentzen den. Edonola ere, horrelako efektu bat zeharkakoa izan litekeela hartu beharko litzateke kontutan.

Bestelako garraio hipotesiak mahai gaineratzea ere interesgarria litzateke. Beste aukera bat, FlbB-ren lekuko itzulpena litzateke. Neuronetan kasu, axoietan lokalki sintetizatzen diren hainbat seinalizazio faktore deskribatu dira (Rishal eta Fainzilber, 2014; Koley *et al.*, 2019). Kasu honetan beraz, mRNA izango litzateke puntarantz garraiatzen dena. mRNA-ren garraio eta lokalizazio polarra, lekuko itzulpenaz batera, onddoen hazkuntza polarrean ere mekanismo garrantzitsua da (Zarnack eta Feldbrügge, 2007). Alabaina, mRNA-ren garraioa ere MT eta aktina harizpitan zehar burutzen da (Zarnack eta Feldbrügge, 2010); beraz, MT-en beharraz aurrez aipatutako kontraesan bera daukagu. Edonola, aukera hau aztertzeko, interesgarria litzateke FlbB-ren mRNA-aren lokalizazio subzelularra aztertzea, ea gunee apikalean mRNA-ren presentzia hauteman daitekeen.

### 1.1.2. FlbB eta FlbE konplexuaren konformazioa.

Bere egiturak garraioan, lokalizazioan eta seinaleen transdukzioan izan lezakeen garrantzia aintzat harturik, FlbB eta FlbE-k osatutako konplexu proteikoaren konformazioa determinatzea etorkizunean mugarri izan daiteke. Besteak beste, FlbB-ren bZIP eremua FlbE-z heterodimeroa osatzeko ezinbestekoa eta nahikoa da *in vitro pull-down* entseguen arabera, barne hartzen duen dimerizazio eremuak rol garrantzitsua lukeelarik (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Bestalde, FlbB-ren C-terminaleko 272 eta 382 zisteinek konplexu proteikoaren punta lokalizazioan ezinbestekoak direnak (Herrero-Garcia *et al.*, 2015; Otamendi *et al.*, 2019), bi proteinen arteko interakzioan parte-hartzen zutela proposatu izan da, ezinbestekoak ez diren

arren. Aurrez, nahiz doktorego tesi honetan ikusi dugunaz, ez dirudi baina zisteinek interakzioan zuzenean dihardutenik. Aitzitik, egun ez dago esaterik konplexuaren konformazioan diharduten, edo garraio sistemaren edo/eta puntarekiko lotura-gune gisa jokatzen duten. FlbE-ri dagokionez, eremu funtzionalen azterketak (Cortese *et al.*, 2011; Otamendi *et al.*, 2019) gune ugariren garrantzia berretsi zuen, horien funtzio jakinak zehaztu ez diren arren. Esku artean diren datuak, baina, ez dute korformazioa zehatz aurreratzeko biderik ematen, eremu funtzional horien bitartekaritza argitzeko baitago besteak beste. Ondoko 6.1. irudian HawkDock Server, proteina-proteina konplexuen egitura iragarpen eta analisirako web zerbitzariak, proposatutako (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>; (Weng *et al.*, 2019)) FlbB eta FlbE proteinen SWISS-MODEL-k modelatutako eremuen konformazio iragarpena aurkezten da. FlbB-ren kasuan irudian bZIP eremua jasotzen da; hain zuzen eremu hau ezinbestekoa da FlbE-rekiko interakzioan (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Bestalde, irudian FlbB-ren homodimeroa irudikatzen da, egun oraindik ez dakigu baina FlbB-ren homodimerizazioa ematen denik.



**6.1.irudia: FlbB(80-144) eta FlbE(121-152) arteko konformazioaren aurreikuspena.** HawkDock Server zerbitzariak (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>), FlbB eta FlbE proteinen SWISS-MODEL programaren modelatuetatik abiatuz, osatu duen hiru dimentsiotako konformazio predikzioa erakusten da irudian. Zerbitzariak, -49.74 kcal/mol-ko konplexuaren lotze energia askearekin, lehenetsitako modeloa da. Bi irudiak FlbB-FlbE hiru dimentsiotako konformazio egitura berari dagozkie, angelu desberdinetatik begiratuta. Esan bezala, ez da proteina osoaren egitura irudikatzen. FlbB-ren kasuan 80-144 arteko aminoazidoen egitura modeloa erakusten da; eremu honetan bZIP eremua kokatuko litzateke. Hain zuzen, eremu hau FlbE-rekiko *pull-down* entseguetan FlbE erretentitzeko ezinbestekoa dela ikusi da (Herrero-Garcia *et al.*, 2015). FlbE-ri dagokionez, 121-152 arteko aminoazidoak jasotzen dira, (Cortese *et al.*, 2011) lanean adierazten den E5 eremuari legokioke eremu hau beraz.

## 6. KAPITULUA:

---

Bi proteinen konformazioa experimentalki determinatzeko, egun, BioGUNE ikerketa zentroko Marcelo Guerinen taldearekin elkarlanean, proteinen kristalografian oinarriturik (Ilari eta Savino, 2017) X-izpien bitartez egitura espazialaren determinazioa abiatu da. Elkarlana hasierako fasean dagoen arren, FlbB-ren kristalizatorako proteina kantitate egokia izateko, berau *E. coli*n adieraziko da, esperimentu honetarako berariaz eraikitako plasmidoaz (ATG Biosynthetics, Merzhausen, Alemania). Diseinatutako sekuentzian, FlbB-k etiketa egokiak atxikita daramatza, gerora, purifikazio urratsak bermatzeko. Proteina bakoitzaren egitura hirudimentsionala ezaugarritzen saiatzeaz gain, FlbB eta FlbE-ren kimerak dituzten *E. coli*-ren erauzkin proteikoak elkartuko dira konplexuaren konformazioa determinatzeko. Alabaina, kontuan izan behar da konplexuan proteina gehiagok ere parte-har lezaketela eta horiek ere FlbB-ren konformazioan eragin dezaketela. Egituraren inguruko datuek nahiz proteomikaz eskura genitzakeen ustezko interaktoreen identifikazioak, erantzuteko dauden galderak aztertzeke aukera emango dutela espero da. FlbB-ren garraio akropetala ulertzeko baliagarriak izateaz gainera, zelula polarizatueta TF-ak polarizazio lekuetara nola garraiatzen diren ulertzeko oinarritzko informazioa eskainiko dute.

### 1.2. FlbB-ren garraio basipetala eta nukleoetan barneratzea.

Oraindik zehaztu ez den seinale batek induzituta, eta ezagutzen ez den mekanismo baten bitartez, FlbB-k FlbE-rekiko kidetza hautsi (Otamendi *et al.*, 2019) eta puntatik askatuko litzateke nukleotaranzko bidea abiatzeko. (Perez-de-Nanclares-Arregi eta Etxebeste, 2014) lanean FlbB::Dendra2-ren fotokonbertsioaren metodologia martxan jarri eta gero, (Herrero-Garcia *et al.*, 2015) lanean baieztatu ahal izan zen FlbB-ren puntatik nukleoranzko dinamika bazela, aurrez puntan detektatutako FlbB frakzioa aurrerago nukleoan detektatu baitzen. Bestalde, garraio basipetal hau MT-en baitakoa dela deskribatu da (Otamendi *et al.*, 2019), baina egun ez da bitartekari lanetan diharduen elementurik zehaztu. FlbB-ren baitan aurkitzen den



NLS kontsentsu bipartitaren antzeko sekuentziak (Cortese *et al.*, 2011), bai eta honen mutazioz FlbB-ren lokalizazio nuklearraren galerak (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), KapA eta KapB inportinen esku-hartzea iradokitzen zuten. Inportinen funtzio den karguen nukleo-barneratze hutsaz haratago (Oka eta Yoneda, 2018), FlbB-ren garraio basipetalean ere parte-har zezaketela proposatu izan zen, neuronetan inportinek aurkeztu izan duten distantzia luzetako garraiolari funtzioa oinarri hartuta (Hanz *et al.*, 2003). Edonola, orain arte ez da FlbB-ren eta KapA-ren bitartekaritza zuzena baieztatu (Ikus 4. Atala).

Doktorego tesi lan honetan, FlbB-ren garraio basipetalerako MT-en beharra aintzat harturik, dineina proteina motorra garraiolari posibletzat aztertu zen. Bide honetatik, *nudA1* mutazio termo-sentikorraz burututako esperimenduetan, dineinaren parte-hartzea iradokitzen zuten emaitzak lortu dira. Dineinaren bitartekaritza FlbB-ren garraio basipetalaren giltzarri izan daiteke beraz, baina aldi berean honek garraio mekanismoaren inguruan galdera gehiago proposatzera garamatza. Izan ere, dineinaz batera hainbat erregulatzailek eta faktorek osatzen baitute dineina bidezko garraio sistema konplexua.

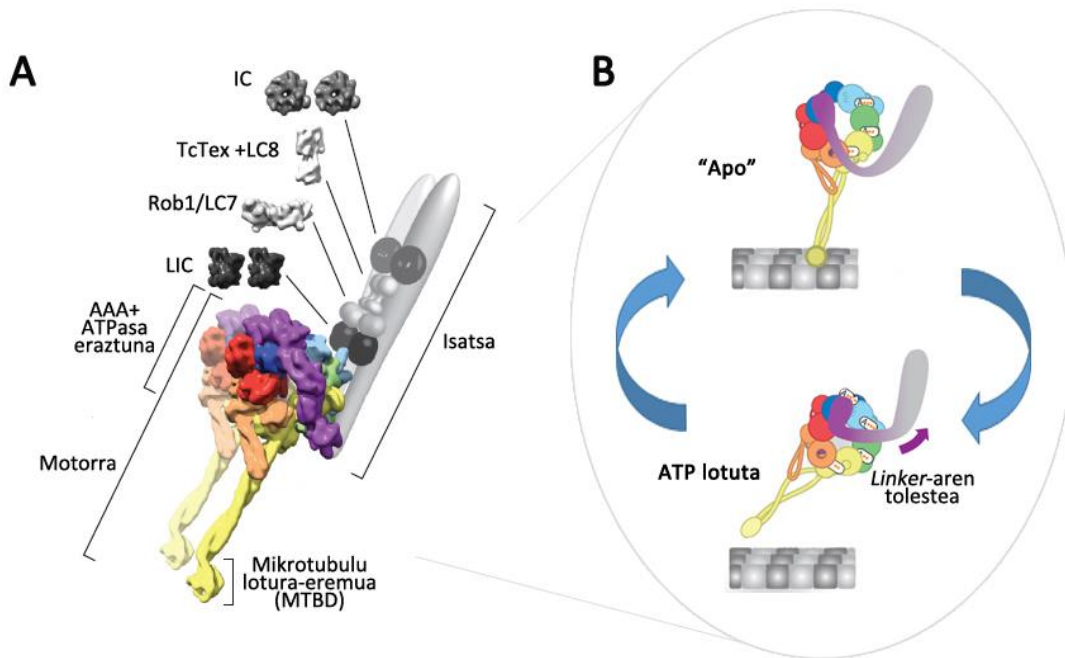
Dineina zitoplasmatikoa deritzonak hainbat funtziotan dihardu zelula eukariotoetan. MT-ak euskarri, hainbat karguren distantzi luzeko garraio erretrogradoan eta organuluen distribuzio egokian parte-hartzen du proteina motor honek, MT-en minus ertzeranzko norantzan garraibide edo motor molekular zitoplasmatiko bakarra izaki (Vale, 2003). Dineina ia genoma eukariota guztietan aurkitzen da kodetuta, loredun landare, alga gorri eta *Entamoeba* (protisten erreinuko eta amaebozoo filum barruko genero bat) taldetan salbu (Wickstead eta Gull, 2007); aitzitik, dineinaren funtzionamendu egokia funtsezkoa dute hainbat organismok (ikus Cianfrocco *et al.*, 2015 *review*-ko erreferentziak). Dineinaren jarduna kaltetzen duten dineina beraren edo honen erregulatzaileen mutazio puntualak gaixotasun neurologiko ugariaren iturburu dira pertsonetan (ikus Canty eta Yildiz, 2020, *review*-ko erreferentziak). Hain zuzen,

## 6. KAPITULUA:

---

dineinak neuronen axoietan garraio erretrogradoan duen parte-hartzeagatik (Hirokawa *et al.*, 2010), ikerketa askoren interesgune izan da dineina bidezko garraio sistema.

Egiturari dagokionez, dineina hainbat kate polipeptidikoz osatutako konplexu proteikoa da. Horien artean, kate astunenaren (HC, *heavy chain*) homodimeroak gorpuzten du dineinaren bizkarrezurra. Hain zuzen, lan honetan aztergai izan den *nudA* geneak *A. nidulans*-n dineinaren HC-a kodetzen du (Xiang *et al.*, 1995c). Kate astunaren dimero honetan bi eremu bereizten dira, isatsa (HC-aren N-terminal ertza) eta motor aktibitatea duen eremua (HC-aren C-terminal ertza) (Cianfrocco *et al.*, 2015; 6.2A irudia). Isatsa deritzon eremura lotzen dira gainerako dineina subunitateak eta HC-aren dimerizazio eremua bertan aurkitzen da ere. Hirugarrenik, eremu honek karguen loturan hartzen du parte. Bien bitartean, motor aktibitatea duen HC-aren eremua, dimero eran noski, MT-etara lotzeaz eta hauetan zehar mugitzeko beharrezkoa den indar mekanikoa sortzeaz arduratzen da. HC bakoitzaren eremu motorrean, elkar lotutako 6 AAA+ (*ATPases Associated with various Activities*) eremuk osatutako eratzun bat aurkitzen da (6.2A irudia). ATPasa eremu nagusia lehen AAA eremua (AAA1) dela kontutan harturik, eratzun honi esker ATP-aren hidrolisiz lortutako energia baliatzen da dineinaren mugimendua ahalbidetzeko. Eratzunaren AAA4 eremutik *coiled-coil* egiturako zurtoin moduko bat ernetzen da, zurtoinaren beste ertzean MT-etara lotzeko (MTBD, MT *binding-domain*) eremua aurkitzen delarik. Zurtoin hau AAA5 eremutik abiatzen den bigarren *coiled-coil* egitura batez sendotzen da. AAA1 gunea eta MT-ekiko MTBD-aren lotzea alosterikoki koordinatuta daude zurtoinaren bidez (6.2A irudia). Bestalde, AAA+ eratzunari lotuta  $\alpha$ -helize segmentuez osatutako *linker* egitura bat aurkitzen da, dineinaren mugimenduan ezinbestekoa dena. Izan ere, AAA+ eratzunak eragindako ATP molekulen hidrolisiaz *linker*-aren konformazio aldaketak ematen dira, eta hauek sortzen duten bultzadak mugiarazten du dineina (6.2B irudian irudikatzen da *linker*-aren konformazio aldaketa).



**6.2. irudia: Dineinaren egitura.** A) Dineina hainbat subunitatez dago osatua. Dineinaren bizkarrezurra bi kate astunen (HC) dimeroak osatzen du, hainbat subunitate edo kate osagarriekin batera: erdibidekoa (IC, intermediate); erdibideko arina (LIC, light intermediate) eta hiru kate arin mota (LC, light: TcTex, LC8 eta Rob1). Dineinaren egitura bi eremutan bereizten da, motorra (MT-etan barrena mugitzeaz arduratuko dena) eta isatsa (dimerizazio eremua izateaz gain, dinaktina eta kargu adaptadoreaz lotzen den gunea) (Carter *et al.*, 2016; Cianfrocco *et al.*, 2015). Motorra deritzan eremuan, ATP hidrolisiaz arduratzen den 6 AAA+ guneek osatutako eraztuna dago. Eratzunetik zurtain moduko bat luzatzen da (horiz), MT-ra lotura ahalbidetuko duena MTBD eremuaren bitartez. Eta azkenik, more kolorez, *linker*-a aurkitzen da. ATP molekularen hidrolisiaz askatutako energia kimikoa mugitzeko indar bilakatzea helburu du motor eremuak, eta era berean motorraren mugimenduaz isatsera lotutako karguaren mugimendua lortzen da. Irudia (Cianfrocco *et al.*, 2015) lanetik hartua. B) Irudi honen goialdean, dineinaren "apo" edo hasierako konformazioa (ATP molekula sartu aurretik) irudikatzen da. ATP-a AAA+ eraztunera lotzeak dineina MT-tik askatzea eragiten du, eta hidrolisiaz batera *linker*-aren tolestea gauzatzen da. Aurrerago, tolestutako *linker*-ak zuzentzera jotzen duenean, sortutako bulkadak dineinaren "aurrera pausua" eragingo du. Irudiak (Cianfrocco *et al.*, 2015) lanean aurkitzen diren etik moldatu dira.

Dimeroko motor eramuetako batean ATP hidrolisi ziklo bat osatzeaz urrats bat ematen dela kontsideratzen da (Carter *et al.*, 2016; Cianfrocco *et al.*, 2015). Zikloaren hasiera ATP molekula bat AAA1 gunera lotzean abiatzen da. Lotze honek, dineinaren MT-arekiko afinitatea jaistearekin batera, zurtainaren askatzea dakar. Ondorioz, *linker*-aren konformazioa birmoldatu beharrean, tolestu egiten da (6.2B irudia behealdean) eta ATP molekularen hidrolisia gauzatzen da. Jarraian, dineina MT gune berri batera lotzen da, minus noranzkoan aurreko posizioan legokeen lotura gunearekiko, hain zuzen. AAA1 eremutik fosfato taldearen askatzeak *linker*-aren

## 6. KAPITULUA:

---

tolesduraren zuzentzea eragiten du, bulkada bat emanez. Mugimendu honek dineinaren isatsetik aurrerantz tira egiten du, bigarren motor eremua eta atxikitutako kargua ere mugiaraziz. ADP-ren askatzeak zikloaren abiaburuko apo formara darama (6.2B irudian ikus apo forma).

Dineinaren tamaina eta konplexutasuna dela eta, lan-talde ugari honen lan mekanismo eta erregulazio bideak zehazten saiatu da. Dineina bidezko garraioan, dineinaz batera, hainbat erregulazio faktorek hartzen du parte, dineinaren aktibitaterako ezinbestekoak direnak. Besteak beste, dinaktina eta kargu adaptadoreak, hainbat erregulatzaile gehiagorekin batera. Legamien kasuan, dineina bera bakarrik, kofaktorerik gabe eta *in vitro*, ahalmen motorra (MT-etan barrena luzez mugitzeko gaitasuna) badu ere (Reck-Peterson *et al.*, 2006), ugaztunetan erregulatzaileen bitartekaritza ezinbestekoa da (Torisawa *et al.*, 2014). Edonola ere, dineinaren ahalmen motorra dinaktinaren gehitzeaz hobetu egiten dela ikusi izan da (King eta Schroer, 2000), eta efektu hau are nabarmenagoa da kargu adaptadoreen gehikuntzaz (McKenney *et al.*, 2014; Schlager *et al.*, 2014). Bestalde, hainbat kargu dineina taldeekin batera mugitzen dira, dineina molekula bakar batekin baina hobea omen delako ahalmen motorra (Urnavicius *et al.*, 2018).

Dinaktina subunitate proteiko ugari osatuta dago. Egiturari dagokionez, Arp1 (*actin related protein 1*) harizpia oinarri hartuta, beso luzeko egitura kakoduna egituratzen da. Besoa, tamaina handieneko p150 subunitatearen homodimeroak gorpuzten du eta monomero bakoitzaren N-terminal ertzean CAP-Gly MT-kiko lotzeko eremua aurkitzen da (Urnavicius *et al.*, 2015). *A. nidulans-en* kasuan ere, dinaktinaren bitartekaritza azpimarratzekoa da, batetik dineina MT-en plus ertzean pilatzeko beharrezkoa baita, hau ezinbesteko urratsa delarik garraio basipetala abiarazteko. Bestetik, dinaktinak dineina-kargu arteko elkargoan eta dineinaren ahalmen motorrean ere hartzen du parte (Zhang *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2018).

Dineinak izaera anitzeko kargu ugari garraiatu ohi ditu. Proteina motor berak hainbeste kargu desberdin mugitzeko gaitasuna izateak zientzialarien arreta piztu du. Dineinaz zuzenean

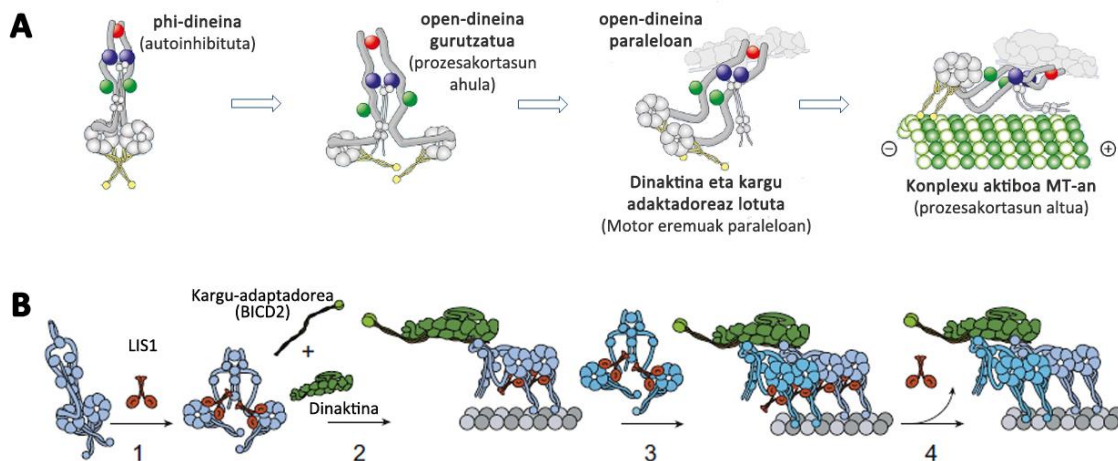
interakzionatzen duten karguak identifikatu dira, zeintzuek dineinaren isatseko kate osagarriez eta dinaktinaz lotzen diren (Allan, 2011). Alabaina, karguekin sortutako loturak ikertu ahala, adaptadoreen eta hauen funtzioen inguruko ezagutza zabaltzen ari da (Reck-Peterson *et al.*, 2018). Hain zuzen, kargu eta dineina arteko lokarri funtzioaz haratago, badirudi dineinaren mugikortasunean ere funtzio garrantzitsua bete dezaketela kargu adaptadoreek. Ugaztun zeluletan ikusitakoaren baitan, dinaktinaren bitartekaritza funtsezkoa izan arren, dineina eta dinaktina arteko lotura, izatez, ahula da (Splinter *et al.*, 2012). Lotura hau nabarmenki indartsuagoa zela ikusi zuten Bicaudal-D2 (BICD2) deritzon kargu adaptadorearen presentzian (Splinter *et al.*, 2012). Are gehiago, *in vitro* burututako saiakuntzetan, dineina-dinaktina konplexuaren ahalmen motorra bera ere BICD2-ren gehikuntzaz hobetu egiten dela deskribatu izan da (McKenney *et al.*, 2014; Schlager *et al.*, 2014). Pertsonengan aurki daitekeen *coiled-coil* egiturako BICD2 homodimero honek Golgi besikula, nukleo eta mRNA-k kargu gisa dineinara lotzen ditu (Dienstbier eta Li, 2009). (Urnavicius *et al.*, 2015) lanean, lehen aldiz, BICD2-ren egitura determinatu zen dineina eta dinaktinaz lotuta. Cryo-EM (*Cryogenic electron microscopy*) azterketaren arabera, BICD2-ren N-terminal ertza dinaktinaren harizpiaren luzera osoan zehar elkartuko litzateke eta dineinari dinaktina harizpira lotzen lagunduko lioke, hiruen konplexu sendoa osatuz. Egun, adaptadoreen zerrenda luzatzen doa, *coiled-coil* egitura duten hainbat proteinek dineina-dinaktina konplexua aktibatzen dutela deskribatu delarik, adaptadoreen aktibazio funtzioa berretsiz (Reck-Peterson *et al.*, 2018). Aktibatzaile gisa jarduteaz gain, hainbat adaptadorek bigarren dineina konplexu baten elkartzea ahalbidetzen dute, ahalmen motorra eta abiadura hobetuz (Urnavicius *et al.*, 2018). Ez dirudi ezagutzen diren karga adaptadoreen artean sekuentzia homologorik kontserbatzen denik; alabaina, *coiled-coil* egitura luzeak errepikatzen dira, eta normalean zenbait egitura eremu ere partekatzen dituzte, CC1 box (AAXG aminoazido sekuentzia) edo Hook eremuak kasu (Reck-Peterson *et al.*, 2018; Canty eta Yildiz, 2020).

## 6. KAPITULUA:

---

Dineina bidezko garraioaren aniztasuna eta konplexutasuna dela eta, dineinaren aktibazioa momentu eta leku egokian izan dadin erregulazio mekanismo desberdin ugariak dihardu (ikus Carter *et al.*, 2016, *review-a*). Erregulazio adibide bat karguaren lotzea izan daiteke. Kargua BICD2 adaptadorearen C-terminal eremuan lotzean soilik geratzen da aske *coiled-coil* egitura, dineinaren eta dinaktinaren lotura ahalbidetuz (Hoogenraad *et al.*, 2003). Edonola, ez dago ziur beste adaptadoreak ere modu berean erregulatzen direnik, mekanismo honek ez dirudi behintzat garrantzia bera duenik adaktodoretan (Carter *et al.*, 2016). Ugaztunon dineinaren adibidearekin jarraituz, dinaktina eta kargu adaptadoreen faltan dineinaren ahalmen motorra baxua izateak, dineinak bere burua autoinhibitu egiten duela iradokitzen du. Dineinak konformazio desberdinak izaki, badirudi autoinhibizio hau dineinaren motor eremuen dimerizazioz osatutako konformazio “bihurrituak” eragina dela (Torisawa *et al.*, 2014) (6.3A irudian, ezkerrean). Cryo-EM azterketen arabera autoinhibizioa nagusiki *linker*-en arteko, *linker*-AAA5 eta AAA4-AAA5 eremuen arteko interakzioak eragiten dute (Zhang *et al.*, 2017). Greziar  $\phi$  ( $\phi$ ) hizkiaren itxuragatik (6.3A irudian, ezkerrean)  $\phi$  izenez ezagutzen den konformazioaren ondorioz, dineinak MT-ekiko afinitate baxua aurkezten du eta ez da MT-etan zehar jarraikortasunez ibiltzeko gai.  $\phi$  konformazioak, bestalde, dinaktinaren lotzea eragozten du (Zhang *et al.*, 2017). Autoinhibizio konformazio honen eragina aztertzeko, bi motor eremuen interakzio guneetan mutazio puntualak txertatu ziren (Zhang *et al.*, 2017). Dimeroa haustean dineinaren MT-ekiko afinitatea hobetu zela baieztatu zuten. Bestalde baina, bi motor eremuak bereizita edukitzeak, *open* konformazioa deritzonak, ez du dineinaren ahalmen motorra bermatzen. (Zhang *et al.*, 2017) lanean bertan, motor eremuak konstitutiboki banatuta mantentzen zituen dineina mutantea, bera bakarrik, dinaktina eta BICD2 kargu adaptadorerik gabe, distantzia luzeetan mugitzeko gai ez zela ikusi zuten. Badirudi, egileen arabera, bi *open* konformazio desberdintzen direla. *Open* lehen konformazioan (6.3A irudian, bigarrena) bi motor eremuak bata besteari begira gurutzatuta aurkitzen dira, aldaera hau ere autoinhibitzaila delarik. Aldiz, dineina-dinaktina-BICD2 konplexu moduan dineinaren motor eremuak norabide

berean, paraleloki kokatuta, aurkitzen dira (6.3A irudian, hirugarrena) (Zhang *et al.*, 2017). Hain zuzen, motorren konformazio paralelo honek MT-etan zehar mugitzea ahalbidetuko lioke dineinari (6.3A irudian, laugarrena). Konformazio aldaketa honetarako dinaktina dineinara lotzen da isatsak norabide berean zuzendu araziz eta motorren berrorientatzea eraginez. Beraz, argi geratzen da dinaktinaren eta kargu adaptadoreen bitartekaritza dineinaren konformazio egokirako eta bere aktibitatearen erregulaziorako beharrezkoak direla (Canty eta Yildiz, 2020).



**6.3. irudia: Dineinaren aktibitatea erregulatzeko diharduten konformazioak.** A) Dineinaren hiru konformazioak erakusten dira. Lehen irudian, *phi* konformazio bihurritua irudikatzen da. Konformazio honetan motor eremuak dimerizatuta daude eta egitura autoinhibitzailea da. Konformazio hau duen dineina ez da MT-ra lotzen. Dinaktinarik ere ez da bertara lotzen. Bigarren irudian konformazio irekia erakusten da. Honetan, motor eremuak gurutzatuta aurkitzen dira eta, ondorioz, forma hau ere autoinhibitzailea da. Hirugarren eta laugarren irudietan dineina (*open* konformazioaz), dinaktina eta kargu adaptadoreekin lotuta irudikatzen da. Motor eremuak paraleloan daude kokatuta, forma honek MT-ekin lotzea eta hauetan zehar mugitzea baimentzen duelarik. Kasu honetan, dineina aktiboa litzateke. Irudia (Zhang *et al.*, 2017) lanetik hartua eta moldatua izan da. B) Deskribatutakoaren arabera, LIS1-en funtzio nagusia dineinaren aktibazioan laguntzea da, honen forma irekia bultzatuz lehenik (1) eta dinaktina eta kargu adaptadorearen lotzea erraztuz horrela (2). Dineina molekula batera bigarren dineina baten lotzean ere laguntzen du LIS1-k (3). Jarraian, garraioaz hasterako, LIS1 disoziatu egiten da konplexu proteiko aktibotik (4). Eredua (Canty eta Yildiz, 2020) lanetik moldaketak eginez garatu da.

Dineina bidezko garraioan, dinaktina eta kargu adaptadoreen parte-hartzeaz gain, dineinaren erregulazioan dihardute LIS1-ek eta honen lotze-proteina NudE-k ere. Lisenzefalia gaixotasunaren erantzule gisa identifikatu zen lehen aldiz LIS1, proteina honen disfuntzioak garunaren garapen desegokia eta migrazio neuronal anormala eragiten dituelako (Reiner *et al.*, 1993). LIS1-en eta NudE-ren ezaugarritze funtzionalean modelo fungikoak oso baliagarriak izan

## 6. KAPITULUA:

---

dira; izan ere, lehen aldiz, LIS1 eta NudE proteinak harizpi itxurako onddoetan ezaugarritu eta dineinaren funtzioez erlazionatu ziren (Xiang *et al.*, 1995b; Willins *et al.*, 1997; Efimov eta Morris, 2000)). Lehen lan horiek *A. nidulans* onddoan LIS1-en homologoa den NudF nukleoan kokapen egokirako ezinbestekoa dela deskribatu zuten (Xiang *et al.*, 1995b). Beranduago argitaratutako beste lan batzuek, NudF hainbat karguren garraiorako ere beharrezkoa zela erakutsi zuten (Egan *et al.*, 2012b).

LIS1 erregulatzailerak dineina bidezko garraioan diharduela esperimenterik frogatu bada ere, eta betetzen duen funtzioaren azterketa ugari burutu badira ere (ikus Qiu *et al.*, 2019, eta Canty eta Yildiz, 2020, lanetan biltzen direnak), oraindik ez da erregulazio mekanismoa guztiz ezagutzen. LIS1, dinaktina eta kargu adaptadoreak ez bezala, dineinaren motor eremura bertara lotzen da (Huang *et al.*, 2012) (ikus 6.3B irudia). NudF eta NudE-ren lana kargu adaptadore bidezko dineina garraioa aktibatzea da (Egan *et al.*, 2012b; Qiu *et al.*, 2019). Alabaina, dineina eta dinaktina elkarrekin MT-en minus ertzertantz mugitzen diren artean, LIS1/NudF ez da hauekin garraiatzen (Egan *et al.*, 2012b; Qiu *et al.*, 2019). Badirudi garraioa hastearrekin batera LIS1 konplexutik disoziatzen dela, garraio hastarazle gisa diharduelarik (Egan *et al.*, 2012b). Hastarazle moduan nola joka lezakeen ikertu nahian, aurrez aipatu den dineinaren *phi*-konformazio autoinhibitzaileari heldu zioten Qiu eta kideek. (Zhang *et al.*, 2017) lanean egin bezala, dineinaren *phi opening*-konformazio mutantea (*open* formaren baliokide konstitutiboa) sortu zuten NudA-ren, dineinaren HC subunitatearen, R1602E eta K1645E mutazioez. Bada,  $\Delta nudF$  fondo genetikoan NudA<sup>R1602E, K1645E</sup> mutantea gai zen LIS1/NudF-ren gabezia gainditzeko.  $\Delta nudE$  fondo genetikoan ere, konformazio irekiko dineina mutanteak ez zuen garraio kalterik erakutsi (Qiu *et al.*, 2019). Nahiz eta dineinaren aktibaziorako LIS1 eta NudE beharrezkoak izan, *phi opening*-konformazioa duen dineina mutatuak ez du LIS1 eta NudE-ren bitartekaritzarik behar MT-en minus ertzertantz mugitu ahal izateko. Beraz, honek iradokiko luke *A. nidulans*-n LIS1-k *phi* konformazio autohinibituaren irekieran diharduela, jarraian dineina, dinaktina eta kargu adaptadorearen arteko konplexuaren osaketa ahalbidetuko lukeena (6.3B irudia). *Open*



konformaziorako aldaketa dineinaren aktibaziorako ezinbesteko urratsa izaki, konformazio aldaketa hau bideratzea litzateke LIS1-en funtzio giltzarria. Edonola ere, ez da baztertzeko LIS1/NudF-k funtzio gehiago izatea, NudA<sup>R1602E, K1645E</sup> mutanteak hein batean LIS1-en gabezia gainditzen duen arren, ez baitu guztiz zuzentzen (Qiu *et al.*, 2019). NudE-ren kasuan, LIS1-en gain-adierazpenak NudE-ren gabezia gandi dezakeela kontutan harturik (Efimov, 2002), *phi* formaren irekieran zuzenean ez baina LIS1-en lotzea lagun dezakeela proposatzen dute (Qiu *et al.*, 2019). Bestalde, ugaztunetan egin diren zenbait ikerketek, LIS1-en funtzio nagusia dineina bat baino gehiago duten konplexuak osatzea litzatekeela proposatzen dute (Htet *et al.*, 2020). Horretarako, LIS1 dineinaren konformazio irekiera lotuko litzateke, berau *phi* konformaziora ez itzultzeko. Honela, dinaktinaren nahiz kargu adaptadoreen batzeko probabilitatea handiagotuko litzateke, bai eta bigarren dineina molekula bat elkartzekoa ere (Canty eta Yildiz, 2020) (6.3B irudia).

Doktorego tesi honi dagokionean, FlbB-ren garraio basipetala dineinaren bitartez gauza daitekeela ikusirik, aurrera begira interesgarria litzateke dineinarekin batera FlbB-ren garraioan diharduten erregulatzailak identifikatu eta erregulazio mekanismoak aztertzea. Besteak beste, dineina eta FlbB-ren arteko lotura nola gauzatzen den aztertu beharko litzateke lehenik, kasurako ea FlbB-k zuzenean interakzionatzen duen dineina-dinaktinaz edo kargu adaptadore ugarien artean (Reck-Peterson *et al.*, 2018) baten bat litzatekeen bitartekari.

Aukeren artean, posible litzateke hifen subapizean endozitosiz bideratzen den material ugariaren moduan, FlbB ere endozitosi sisteman sartu eta endosomen bidez garraiatua izatea atzerantz nukleoetarantz. *A. nidulans* onddoan dineina bidezko endosoma goiztiarren garraioan HookA proteina ezinbestekoa dela ikusi da, endosoma goiztiarren kargu adaptadore gisa diharduela iradokiz (Zhang *et al.*, 2014). Hook proteinen familia hainbat organismo eukariototan kontserbatuta dago. Lehen aldiz, endozitosian eta xixkuen garraioan defizientziak zituen *Drosophila melanogaster*-en Hook mutantearen bitartez identifikatu zen (Krämer eta Phistry,

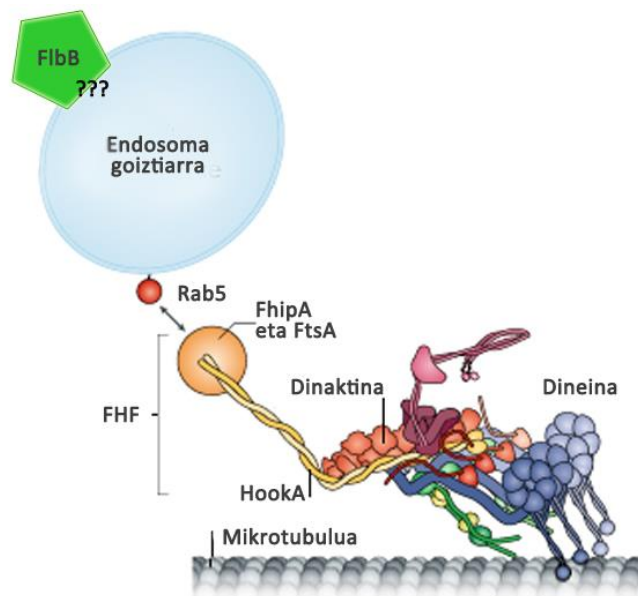
## 6. KAPITULUA:

---

1996). Ugaztunotan hiru Hook homologo aurkitzen dira (Hook1, Hook2 eta Hook3). Hook1 eta Hook3 dineina bidezko endosomen garraioaz erlazionatu izan dira axoietan (Guo *et al.*, 2016). Hain zuzen, aurrez deskribatu den BICD2-en moduan Hook-k dineinaren aktibazioan dihardu (Schroeder eta Vale, 2016), kargu adaptadoreen taldean kokatu ohi delarik.

Honela bada, interesgarria litzateke HookA-k FlbB-ren garraioan diharduen aztertzea. HookA-k, Hook proteinen moduan, *coiled-coil* egitura luzea eta C-terminal ertzean kargua lotzeko eremua ditu (Zhang *et al.*, 2014). Ugaztunetan Hook proteinak Fused Toes (FTS) eta Hook-Interacting Protein (FHIP) proteinekin FTS-Hook-FHIP (FHF) konplexua osatzen du (Carter *et al.*, 2016). Bada, HookA-k ere FHF konplexu moduan dihardu, eta FtsA (*A. nidulans*-n FTS) eta FhipA (*A. nidulans*-n FHIP) konplexu kideak beharrezkoak ditu endosoma goiztiarrekin interakzionatzeko, proteina horien gabeziak endosomen deslokalizazioa eragiten duelarik (Yao *et al.*, 2014). Badirudi HookA-ren C-terminal ertzaz batzen direla FtsA eta FhipA proteinak, eta FhipA dela endosoma goiztiarrez lotura zuzenena lukeena (Yao *et al.*, 2014). Edonola, FHF konplexuaren eta endosoma goiztiarren arteko lotura zehatz nola gauzatzen den ez dago guztiz argi. FhipA ez du mintz bitarteko eremurik, beraz, baliteke endosoma goiztiarrekiko interakzioa ahalbidetuko luketen proteinak aurkitzea. Lan honetan jardun lezakete seguruenik Rab5 GTPasa-ek, endosoma goiztiarrekiko espezifikoak diren Rab erako GTPasa-k (Guo *et al.*, 2016; Carter *et al.*, 2016). *A. nidulans*-n bi Rab5 paralogo aurkitzen dira, RabA eta RabB, hain zuzen, endosoma goiztiarren markatzaile gisa sarritan erabiltzen direnak (Abenza *et al.*, 2010). FHF konplexu hau endosoma goiztiarren eta dineina-dinaktinaren arteko bitartekaritza ezinbestekoa delarik (6.4. irudian laburbiltzen da orain arte azaldutakoa), FlbB-ren endosoma bidezko garraio basipetal hipotetikoa aztertzeko aproposa litzateke aipatu ditugun bitartekaritza elementuek (HookA, Rab5) FlbB-rekiko izan lezaketen harremana aztertzea. Kasurako, FlbB proteinen adierazpen baxuak kolokalizazio azterketak zaildu egiten baditu ere, FlbB-ren lokalizazioa azter genezake  $\Delta hookA$ ,  $\Delta rabA$  edo  $\Delta rabB$  fondo genetiko nuluetan, ea bZIP TF-a nukleoetara irits daitekeen. Hain zuzen, fondo genetiko nulu horiek iada sortuak dira eta

bibliografian aztertu da konidiazioari dagokionez izan dezaketen fenotipoa. HookA-ren kasuan, honen mutante den *eedA1*-k konidiazio eragozpenak aurkezten baditu ere, ez da erabatekoa; edonola, kolonia fenotipo txikiagoa eta bilduagoa erakusten ditu (Zhang *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2014). Rab5-en kasuan,  $\Delta rabA$  edo  $\Delta rabB$  fondo genetiko anduiek 37°C-tan ez dute konidiazio arazorik nabarmentzen, alabaina 42°C-tan termosentikortasuna dute. Honela,  $\Delta rabA$ -k hazkuntza eta konidiazio murrizketa aurkezten ditu temperatura errestriktiboan (Abenza *et al.*, 2009). Edonola efektu hau nabarmenagoa da  $\Delta rabB$ -ren kasuan.  $\Delta rabB$  anduiaren fenotipoa 42°C-tan nabarmen akonidiala da ohiko kultura medioan, hazkuntza ere nabarmenki txikiagoa delarik bestalde (Abenza *et al.*, 2010). Elementu hauen galerak, hein batean, konidiazioan eragina eduki dezakeen arren, hau zeharkako efektu bat ere izan liteke; beraz, azterketa gehiago burutzea ezinbestekoak da. *Pull-down* entseguez FlbB eta proteina horien arteko interakziorik baden ere azter liteke.



**6.4. irudia: Dineinaren eta endosoma goiztiarren arteko lotze eredu.** Endosoma goiztiarren garraiorako badirudi dineina-dinaktina konplexuarekin HookA kargu adaptadorea lotzen dela. HookA-k, FhipA eta FtsA proteinek FHF konplexua osatzen dute, dineina-dinaktina egitura eta endosoma goiztiarren lotzea ahalbidetzen duena. Bestalde, baina, FHF eta endosoma goiztiarren arteko interakzioa Rab5 GTPasa-ren bitartez gauzatzen dela uste da. FlbB xixkuen trafikoaz atzerantz garraiatuko balitz, pentsa liteke irudiko elementu eta egiturek parte hartuko luketela FlbB-ren garraioan. Irudia (Reck-Peterson *et al.*, 2018) lanean aurkitzen den iruditik abiatuz osatu da.

## 6. KAPITULUA:

---

Bestalde, dineinaren kargu aniztasunaren barruan, proteinak ere zuzenean garraiatuak izan daitezkeela deskribatu da, eta horien artean TF-ak (Reck-Peterson *et al.*, 2018). Honen adibide, neuronetan aurki ditzakegu seinalizazio lanetan aritu eta distantzia luzeko garraio erretrogradoa erakusten duten TF-ak. Axoietan izandako lesioen berri emateko nukleora garraiatuak dira, dagokion erantzuna eragin dezaten (Hanz eta Fainzilber, 2006; Ben-Yaakov *et al.*, 2012; Panayotis *et al.*, 2015). Kasu, axoietako STAT3 TF-ak ezibestekoa du dineinaren bitartekaritza lesio baten aurrean nukleora itzultzeko (Ben-Yaakov *et al.*, 2012). Bestalde, STAT3 eta dineina arteko interakzioan nahiz garraioan  $\alpha$ -inportinak parte har lezakeela iradoki izan da (Ben-Yaakov *et al.*, 2012). Hain zuzen, hau bat letorke neuronetan deskribatu izan den distantzia luzeko garraioan inportinek duten parte hartzearekin (Hanz *et al.*, 2003).

STAT3-ren kasuan bezala, FlbB-ren garraioan ere, dineinaz batera, KapA inportinak karga adaptadore gisa jardun lezakeela pentsa liteke. Doktorego tesi honetan bertan KapA-k FlbB-ren inportazio nuklearraz gain, hifen subapizetik nukleorako garraioan parte hartzen duen ala ez aztertu nahi izan da. Zoritxarrez, ezin izan da ondorio garbirik lortu zentzu honetan. Egindako *pull-down* saiaketetan erretentzio banda oso ahula identifikatu da. Honek bi proteinen artean interakzioa bat badagoela adieraz lezake baina, ezin liteke bereiztu KapA-k inportazio nuklearrean, punta-nukleo garraioan ala bietan diharduen. Argi dago, beraz, KapA-ren ustezko bitartekaritza ezagutzeko azterketa gehiago egin behar direla baina, doktorego tesi honetan lortutako emaitzen arabera, zuzeneko ala zeharkakoa izan, harreman bat badagoela ondoriozta daiteke. Egun iada, Eduardo A. Espeso ikertzailearekin elkarlanean identifikatu diren *kapA*-ren mutante termo-sentikorrek zeregin honetan lagunduko dutela espero da. Fondo genetiko mutante hauetan, FlbB-ren lokalizazio eta dinamika aztertu nahi dira, beti ere temperatura errestriktiboan (37°C). Era berean, egokia litzateke mutante horien erauzkin proteikoa lortzea temperatura errestriktiboan nahiz permisiboan hazitako laginetatik, eta horiekin dineina konplexua eta FlbB-ren arteko interakzioa egon litekeen aztertzea *pull-down* bidez, ea KapA beharrezkoa den garraio konplexua osatzeko.

KapA-ren bitartez FlbB-ren ustezko garraioaren erregulazioa nola gauzatuko litzatekeen ulertu nahian, hipotesi berri bat mahairatu liteke: KapA-ren FlbB-rekiko lotura une egokian gauzatzen dela ziurtatzeko NLS eremuaren eskuragarritasunaz joka litekeela. Honela, FlbB eta FlbE elkarrekin lotzen direnean, konplexuaren konformazioaren ondorio, FlbE-k FlbB-ren NLS eremua ezkutatu lezake KapA bertara ezingo litzatekeelarik lotu. Aukera honen alde jotzen du FlbB/FlbE interakzioan lehenaren bZIP eremua nahikoa eta ezinbestekoa izatea lotura eman dadin (Herrero-Garcia *et al.*, 2015), bien arteko lotura espazialki eremu honetara mugatuz. Aldiz, puntatik FlbB askatzeko FlbE-rekiko interakzioa inhibitzea beharrezkoa dela proposatu dugu (Otamendi *et al.*, 2019; lan hau). Honek, NLS eremua eskuragarri utziko luke KapA-rentzat, eta nukleorako bidea abia lezake. Aurrez, eztabaida honen 1.1.2. atalean etorkizunera begira proposatu den FlbB eta FlbE-ren egitura hirudimentsionalaren azterketa oso baliagarria izan liteke hipotesi hau baieztatu edo ezeztatzeko.

Ikusi den bezala, dineinaren eta kargu adaptadoreen azterketarako *A. nidulans* eredu organismo oso erabilia izan da, andui errekonbinate ugari eratu eta ezaugarritu direlarik. Lortutako ezagutza baliagarria izan dakiguke dineina eta FlbB-ren arteko ustezko erlazioa aztertzeko, bai eta garraio sistema honen inguruko mugari berriak ezartzeko. Besteak beste, LIS1/NudF-ren bitartekaritza FlbB-ren kasuan ezinbestekoa den azterzea interesgarria litzateke, horretarako *nudF*-ren hainbat mutante termosentikor balia genitzakeelarik (Xiang *et al.*, 1995b).

### 1.3. FlbB eta FlbD-ren bitarteko *brlA*-ren adierazpenaren erregulazioa.

FlbB-ren metaketa nuklearrean nahiz *brlA*-ren transkripzioaren indukzioan FlbD-k ezinbesteko rola jotzen du. Bi TF-ak elkar koordinatuz lotzen dira *brlA<sup>p</sup>*-ra; FlbD-ren faltan,  $\Delta flbD$  fondo genetikoan alegia, FlbB *brlA<sup>p</sup>*-ra ezin da lotu nukleoetatik kanpo geratzen delako (Garzia *et al.*, 2010). Kidetza honetan gehiago sakondu nahian, tesi honetan FlbD-ren funtzioak zehazten saiatu da. Besteak beste, FlbB eta FlbD bi proteinen C-terminal ertzean aurkitzen den

## 6. KAPITULUA:

---

LxxLL aminoazido eremuan jarri da arreta. Eremu hau TF-etan aberastua aurkitzen da *A. nidulans*-en, gainontzeko funtzio ez-nuklearrekin anotatuak dauden proteinek konparatuz (Otamendi *et al.*, 2019b). LxxLL sekuentzia hau, FlbD-ren azterketa bioinformatikoaren arabera, LIG\_NRBOX deritzon motiboari legokioke, ustez errezeptore nuklearretara lotzeko balioko lukeena ([http://elm.eu.org/elms/LIG\\_NRBOX.html](http://elm.eu.org/elms/LIG_NRBOX.html)). Kasurako, interesgarria litzateke FlbD-ren eremu honen mutantea (L309A;L312A) nukleoan lokalizatzen den ezagutzea, DNA lotzeko gaitasuna duen ala ez zehaztea proteina-DNA lotze entseguen (EMSA; *electrophoretic mobility shift assay*) bidez, eta FlbB-rekiko lotze funtzioa betetzen duen aztertu. Zoritxarrez, FlbD-ren N-terminal edo C-terminal ertzen etiketatzeak arazoak ematen ditu, HA<sub>3x</sub> etiketa erabiliz, FlbD-ren funtzioa kaltetzen delako, konidiazioa atzeratuz, eta GFP etiketa erabiliz, ezegonkortasuna handitu eta etiketa bera galdu egiten delako. Etorkizunean, galdera hauei erantzuteko bestelako bitartekoak bilatu beharko dira, aukeretako bat FlbD-rekiko antigorputz espezifiko bat erabiltzea izan liteke. Bestalde, kontutan hartu behar da, LIG\_NRBOX motibo honen azterketarako (Heery *et al.*, 1997) tresna aproposak izan litezkeela bi Flb proteina hauek.

Leuzina eremuez bestalde, FlbD-ren cMyb eremuko mutanteaz ikusi ahal izan da FlbB-ren lokalizazio nuklearra ahuldu egiten dela. Beraz, FlbD-k FlbB-ren metatze nuklearra kontrolatzeaz haratago, FlbD-ren TF jardunak FlbB-ren lokalizazio eta aktibitatean eragin dezakeela pentsa genezake. Posible litzateke FlbD *brlA<sup>p</sup>*-ra lotzea ezinbestekoa urratsa izatea FlbB bera promotorera lotu dadin. TF arteko kooperazio mekanismoen adibideak ugariak dira (Spitz eta Furlong, 2012). Bide honetatik, cMyb motako erregulatzailak kromatinaren irekieran parte har lezakete. Badirudi cMyb eremuko R1 eremua DNA-ra lotzen dela falka baten moduan, korrontez beheko DNA sekuentziaren irekiera posible eginaz (Arratia eta Aguirre, 2013). Hain zuzen, cMyb egiturarekin parekatu izan den SANT erako eremuak kromatinaren remodelazioan parte-hartzen du (Boyer *et al.*, 2002). Kontutan edukita Interpro bezalako sekuentzia analisirako sareko euskarriek cMyb eremua SANT eremua ere izan daitekeela proposatzen dutela, posible litzateke FlbD-ren lotzeaz kromatina irekiera eragin eta hau FlbB-ren lotzerako aurre urratsa

izatea (Mayran *et al.*, 2019). Era honetako TF-*ei* aitzindari ere deritze. Bestalde, ez da bazterten bi proteinen arteko interakzioa gauzatu behar izatea *brlA*-ra lotutako konplexu egonkorra osatzeko. (Tahirov *et al.*, 2002) lanean ikusi zutenez, cMyb eta bZIP familietako transkripzio faktoreek elkarrekin interakzionatzen dute eta, DNA lotze-gune desberdinetara lotu arren, elkarrekin elkarlanean aritzen dira transkripzioa ahalbidetzeko. Testuinguru honetan, azpimarratzekoa da GST::FlbB kimera (*E. coli*-n gainadierazia) FlbD::HA<sub>3x</sub> kimera (*A. nidulans*-en erauzkin proteikoa) erretentzeko gai dela *pull-down* saiaketatan (Oartzabal-Arano, ez argitaratua). Aurreko paragrafoan aipatu bezala, zoritxarrez, FlbD::HA<sub>3x</sub>-z etiketatzean konidiazioa atzeratu egiten da eta, horregatik, emaitza honek zentzu biologikorik baduenetz zehazteke dago. Garzia eta kolaboratzaileek bi TF-entzat *brlA<sup>P</sup>*-an lotze-gune posibleak proposatu zituzten (Garzia *et al.*, 2010), baina doktorego tesi lan honetan ezin izan dira leku hauek benetako itu sekuentziatzat baieztatu. Nahiz eta ustezko itu sekuentzia horiek zalantzan geratzen diren, eremu horiek ezabatuta dituzten DAN sekuentziez EMSA entseguak errepikatzea komeniko litzateke, FlbB eta FlbD-k *brlA<sup>P</sup>*-ra lotzeko gaitasuna mantentzen duten ala ez aztertzeko. Hala balitz, aukera berriak proposa litezke. Eztabaida hau idazten zen bitartean argitaratutako *preprint* lan batean, *Aspergillus niger* onddoan bZIP motako TF-ek GCTGAGTCAGCV sekuentzia lotu zezaketela proposatu zen (Huang *et al.*, 2019) ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*) teknikaz eskuratutako emaitzetan oinarrituz. ATAC-seq teknika hau gero eta erabiliagoa da TF-en lotze dianak identifikatzeko, kromatina askeko eremuen irakurketan oinarrituz (Li *et al.*, 2019). Huan eta kideek identifikatutako sekuentzia honen ia parekoa aurkitzen da *brlA<sup>P</sup>*-n (CCTGAATCAGCA), bi nukleotidoren desberdintasunaz, -2003 bp posizioan (non +1 posizioa *brlA $\alpha$* -ren transkripzio hasierari dagokion). Eremu hau (Garzia *et al.*, 2010) lanean identifikatutako *brlA<sup>P</sup>*-ren G fragmentuaren barruan egongo litzateke, EMSA emaitzen arabera bai FlbB baita FlbD ere lotzeko gai diren fragmentua hain zuzen. Beraz, bZIP lotura-gune hau bat letorke orduko emaitzekin, baina, noski, azterketa esperimentalak beharrezkoak lirateke berau FlbB-ren itu sekuentzia

## 6. KAPITULUA:

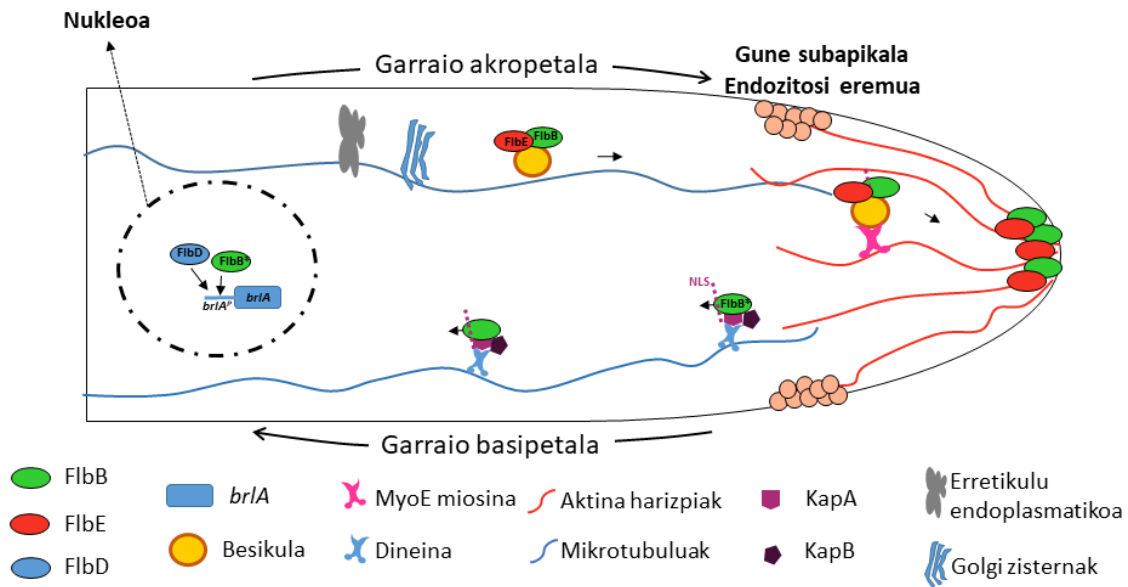
---

bezala baieztatzeko. Bestalde, ATAC-seq teknikaren bitartez  $\Delta flbD$  fondo genetikoan kromatina eremu honen aberastea gauzaten den behatzea ere interesgarria litzateke, kromatina irekitzeko FlbD-ren beharraz informazio baliagarria emango bailuke.

Edonola, *brlA*-ren promotorea garapen asexualaren erregulazioan giltzarri nagusia dela argi dago, hainbat erregulatzailer positibo eta negatibo bertara lotzen baitira (Lee *et al.*, 2016). Nolabait, hazkuntza eta garapenaren (sexual nahiz asexual) arteko erabaki desberdinen bidegurutzeta da *brlA<sup>p</sup>*, hona lotzen diren erregulatzailerak garapen asexuala indutzera edo inhibitzaera joko dutelako, beti ere baldintzen baitan. Bestalde baina, esanguratsua da *brlA*-ren promotorea hainbeste erregulatzaileraren bilgune izanda, *brlA* genearen kontserbazioa eurotiomizetoen klaseko ordena jakinetara mugatzen dela (Etxebeste *et al.*, 2019). Onddoen eboluzioan TF-en emergentzia (sorrera momentua) aztertuz gero, badirudi *brlA*, hau kontrolatzen duten eta korrontez behera aurkitzen diren erregulatzailer asko baina beranduago agertu zela (Etxebeste *et al.*, 2019). Lan honetan azaldu bezala, TF berrien agerpenak sare transkripzionalak eralda ditzake (Nocedal eta Johnson, 2015). Hain zuzen, UDA nahiz CDP bidetako TF-ak, orokorrean, oso kontserbatuta daude Pezizomycotina subfiloko klase ia guztietan. *BrlA*-ren gabeziak Eurotiomizetoen klasekoak ez diren Pezizomycotina subfiloko espezieetan, UDA eta CDP TF-en ortologoek funtzio berdinak ez dituztela zertan kontserbatu behar iradokitzen du (Etxebeste *et al.*, 2019). Horrela, *FlbB*-ren kasuan, bere ortologoaren delezioak ez du konidiazioa kaltetzen hainbat espezieetan (adibidez *Zymoseptoria tritici*-n; Tiley *et al.*, 2018). Aitzitik, *Magnaporthe oryzae*-n *flbB*-ren ortologoaren delezioak konidio ekoizpena areagotzen du (Tang *et al.*, 2015). Badirudi, beraz, beste klasetako espezieetan bestelako funtzioak izan ditzaketela *FlbB*-ren ortologoek, eta eurotialetan, *brlA*-ren agerpenarekin, *FlbB*-ren funtzioa birmoldatu egin zela garapen asexualaren kontrol transkripzionalerantz.

Orain arteko kapituluetan eta eztabaida honetan aztertutakoekin *FlbB*-ren dinamika eta aktibitate transkripzionalaz honako eredu hau garatu da (Otamendi *et al.*, 2019b) (6.5 irudia):





**6.5. irudia: F1000B-ren dinamika eta aktibitate transkripzionala azaltzeko eredu molekularra.** F1000B-ren garraio akropetalarantz dagokionez, F1000B/F1000E konplexu proteikoak besikula berriztatzen da, F1000E-n aurkitzen den ustezko seinale peptidoa dela eta. Subapizetik apizerako garraioa aktina harizpietan zehar emango litzateke, MyoE miosinari esker. Behin puntan, inguru baldintzen baitan, F1000B eta F1000E-ren arteko interakzioa eten, F1000B puntatik askatu, eta dineina arduratuko litzateke F1000B-ren garraio basipetalarantz. Oraindik argitzeke dago, baina KapA inportinak ere atzeranzko garraio honetan parte har lezake. Hain zuzen, F1000E-ren presentzian (garraio akropetalean zehar) F1000B-ren NLS sekuentzia ezkutatuta egon litekeela proposatzen da, KapA-ren garaiz kanpoko lotzea ekidinez. Behin konplexu proteikoak haustean, F1000B-ren NLS seinalea libre geratuko litzateke KapA bertara lotu daitekeelarik eta garraio basipetala abiarazi. Bestalde, F1000D-ren bitartekaritza ezinbestekoa da F1000B-ren metaketa nuklearrean, bai eta *briA*-ren transkripzioaren kontrolean. Bi TF-ak modu koordinatuan *briA*<sup>P</sup>-ra lotzen dira honen transkripzioa aktibatuz. (Otamendi *et al.*, 2019b) lanetik moldatua.

## 2. Konidiazioaren indukzioan hainbat faktorek eta bide genetikok hartzen du parte.

*Δf1000B* anduiaren fenotipo akonidial bereizgarria hainbat konposatuk eragindako estres osmotiko edo gatz estrespean itzularazi daiteke (Otamendi *et al.*, 2019a). Fenomeno hau aintzat harturik, UDA seinalizazio bidez haratago, inguru baldintzen hautematean eta transdukzioan, eta konidiazioaren kontrolean diharduen bide alternatibo baten aukera zabaldu zen; UDA bidea inaktibatuta ere, konidiazioari bide emango liokeena, eta CDP bidearekiko korrontez gora aurkituko litzatekeena. Bide ezezagun honetako erregulatzaileak identifikatu nahian, fosfatoaren (0.65M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eraginpean mutagenesiz lortutako FLIP mutanteen bilduma zabala

## 6. KAPITULUA:

---

eskura gelditu da. FLIP mutante guztiek  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun hazkuntza medioan fenotipo akonidiala erakusten dute, baina elkarren artean bereizten dituzten ezaugarri fenotipiko desberdinak dituzte. Beraz, mutaturako geneek kodetzen dituzten proteinek funtzio askotarikoak izan ditzaketela pentsa liteke.

Mutatutako geneen artean hazkuntza eta polarizazioaren kontrolean parte hartzen duten proteinak kodetzen dituztenak ere badaudela pentsa liteke. Gene horietan aurki litezkeen mutazioek, *flbB*-ren delezioaz batera, efektu gehigarria eragin dezakete hazkuntza eta konidiazioarengan. Hain zuzen, mutanteen fenotipoaren araberako sailkatzea egitean, taldeetako bat (4. taldea) hazkuntza arazoak aurkezten dituzten mutantez osatzen da. Edonola ere, beste talde batzuetan sailkatutako FLIP mutante batzuek ere hazkuntza mugatuxeagoa dute  $\Delta flbB$  andui parentalak baino, FLIP166 bera kasu. Beraz, pentsa liteke polarizatorako beharrezkoak diren geneen mutazioek ere eragina izan lezaketela FLIP fenotipoan. Izan ere, hazkuntza polarra ezinbestekoa da konidioforoen garapenaren hainbat etapetan, metulen hazkuntzan esaterako. Era berean, pRG3-AMA-NotI plasmidoan eraikitako genoteka erabiliz identifikatutako *socA* genea bera ere, delezionatzean ez da eragin fenotipiko nabaririk hautematen fondo genetiko basatian baina,  $\Delta flbB$  fondo genetikoan garapen asexualaren gainean eragina nabaria da. SocA-ren aktibitatea bera ere hifen polaritatearekin erlazionatu da lan honetan, bere gainadierazpenak sortutako hazkuntza arazoak ikusita (ikus 5. ataleko eztabaida).

FLIP166 anduiaren ezaugarritzean jarraitutako prozedura bera jarraituz, tesi hau idatzi bitartean, FLIP57 eta FLIP76 mutanteen genomak sekuentziatu ziren, beti ere, aurrez *pmtC* locus-ean mutaziorik ez zutela konfirmatu ostean. FLIP57-ren kasuan *An10640* genea mutatu dagoela identifikatu da, honek kodetutako proteinak azken 45 aminoazidoak galduak dituelarik (347. posizioko glizina aminoazidoaren lekuan stop kodoi bat aurkitzen baita). Sekuentzia basatiarekin egindako mutante honen protoplastoen transformazioan baieztatu egin da ziklina

bat kodetzen duen gene honen mutazioa dela FLIP57 fenotipoaren erantzule (Agirrezabala eta lankideak, argitaratu gabea). FLIP76 mutantearen kasuan, bere fenotipoa bi mutazioen efektu gehigarria dela pentsatzen da. Batetik, *abpA* genearen Glu742-ri dagokion kodoiean (Ala-ra aldatua; Glu742Ala aldaketa proteina sekuentzian) identifikatu zen mutazioetako bat. AbpA endozitosi prozesuetan diharduen eta aktina lotzen duen proteina da (*actin-binding protein*; Araujo-Bazán *et al.*, 2008). Bestetik, Kapl importina kodetzen duen genean identifikatu zen bigarren mutazioa (kodetzen duen proteinaren ebaketa goiztiarra eragiten duena). Kapl-ren ezaugarritze funtzionala gure taldean burutu zen (Etxebeste *et al.*, 2009b) eta dagokion genearen delezioak, fenotipo akonidiala eragiteaz gain, kolonien hazkuntza erradiala partzialki kaltetzen zen. Mutazio hauek FLIP76 fenotipoaren erantzule direla frogatu ez den arren, proteinen funtzioak, endozitosi eta nukleo inportazio prozesuen kontrola, hala iradokitzen dute. Horrela, azterketa FLIP57-rekin jarraitzea erabaki den arren, FLIP76-ren mutazioek hazkuntza eta garapen prozesuen artean lotura estua dagoela iradokitzen dute.

Hasiera batean, fosfato ioien kontzentrazio altuak eragindako estrespean kondiazioa induzituko lukeen ustezko bide alternatibo baten erregulatzailerak identifikatzea zen helburua. Baina, FLIP166 mutantea fenotipikoki eta genetikoki ezaugarritu ostean, argi geratu da prozesu desberdinen erregulazioan diharduten faktoreek, eta ziurrenik prozesu horiek kontrolatzen dituzten sare genetikoen ere, elkarrekin konexio puntu ugari dutela. Gene bakar bat mutatzear, bide independente batean egindako alterazioa baino, testuinguru zabalago batean eragindako alterazioa bezala ulertu beharra dago, sare genetikoen artean dauden konexioak direla eta. Erlazionatutako bide hauetan eragindako alterazioak “albo-ondorio” bezala uler litezke. Honela, *ΔflbD* fondo genetikoa, FlbD beraren gabeziak ugalketa sexuala kaltetzen duela ikusi izan da (Arratia-Quijada *et al.*, 2012). Maila berean koka liteke NsdD TF-ak ugalketa sexualarengan eragiten duen indukzioa eta konidiazioarengan eragiten duen inhibizioa, *brlA*-ren adierazpena erreprimatuz (Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). Kontrako funtzioa lukete UrdA edo OrsA bezalako TF-ek, ugalketa sexuala erreprimatzeaz gainera, konidiazio patroia egokirako beharrezkoak izaki

## 6. KAPITULUA:

---

(Oartzabal-Arano *et al.*, 2015; Alkahyyat *et al.*, 2015). Azpimarratu beharra dago, UrdA TF-a Eurotiomizetoen klaseko espezetan bakarrik kontserbatzen dela (Nagy, 2017; Etxebeste *et al.*, 2019). Hazkuntza polarraren kontrolean parte hartu eta konidiaziorako beharrezkoak diren erregulatzailleak ere ezagutzen dira (ikus Oartzabal-Arano *et al.*, 2016, *review-a*; ikusi ere, adibidez, Virag *et al.*, 2007), hiru prozesuak estuki lotuta daudela erakutsiz. Etorkizunean, beraz, garapen asexualaren ikuspegi orokorrago eta zabalago bat osatzeko, bide genetiko desberdinak konektatzen dituzten erregulatzailleak identifikatu eta ikertzea interesgarria litzateke. Testuinguru horretan ere, doktorego tesi honetan osatutako FLIP mutanteen bilduma konexio horien identifikazioan baliagarria izan daiteke.

**Ondorioak**



## ONDORIOAK

Doktorego tesi lan honetan zehar lortutako emaitzetan oinarriturik, ondoko ondorio hauek atera dira:

1. FlbB-k puntatik nukleoetaranzko bidea abia dezan, ziurrenik beharrezkoa du FlbE-rekiko elkarrekintza etetea.
2. Dineina proteina motorrak FlbB-ren puntatik nukleoranzko garraio basipetalean dihardu. Bien bitartean, badirudi FlbB-ren eta KapA inportinaren artean elkarrekintza dagoela; edonola, ikusteko dago KapA-ren funtzioa, inportazio nuklearraz haratago, garraio basipetalean ere beharrezkoa den.
3. FlbD-ren DNA lotzeko cMyb eremua eta C-terminal ertzeko LxxLL eremua ezinbestekoak dira FlbB nukleoan pilatuko bada. Ildo beretik, ikusi da cMyb eremua bere horretan ez dela nahiko FlbB nukleoan metatzeko, ez eta konidiazioa eragiteko.
4. SocA ustezko erregulatzailerik transkripzionalaren nahiz PmtC proteinen O-manosiltransferasa entzimaren funtzio ezak,  $\Delta flbB$  fondo genetiko nuluari, efektu gehigarri bat eragiten dute konidiazioari dagokionean. Honela, bi nulo bikoitzek, 0.65M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -dun kultura medioan konidiazio arazoak aurkezten dituzte. Edonola, emaitzek, eta bibliografian deskribatutakoek, *brlA*-ren adierazpena transdukzio bide desberdinetako seinaleak bateratuzetik aktibatzen edo inhibitzen dela iradokitzen dute.





## **Bibliografia**



- Abenza, J.F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., los Ríos, V. de eta Peñalva, M.A. (2010) *Aspergillus* RabB/Rab5 Integrates Acquisition of Degradative Identity with the Long Distance Movement of Early Endosomes. *Mol Biol Cell* **21**: 2756–2769.
- Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodríguez, J.M., Galindo, A. eta Peñalva, M.A. (2009) Long-Distance Movement of *Aspergillus nidulans* Early Endosomes on Microtubule Tracks. *Traffic* **10**: 57–75.
- Adams, T.H., Boylan, M.T. eta Timberlake, W.E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353–362.
- Adams, T.H., Hide, W.A., Yager, L.N. eta Lee, B.N. (1992) Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **12**: 3827–3833.
- Adams, T.H., Wieser, J.K. eta Yu, J.-H. (1998) Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35–54.
- Adzhubei, A.A., Sternberg, M.J.E. eta Makarov, A.A. (2013) Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *J Mol Biol* **425**: 2100–2132.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* **8**: 211–218.
- Ahmed, Y.L., Gerke, J., Park, H.-S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., et al. (2014) The Velvet Family of Fungal Regulators Contains a DNA-Binding Domain Structurally Similar to NF-κB. *PLoS Biol* **11**: e1001750.
- Alkahyyat, F., Ni, M., Kim, S.C. eta Yu, J.-H. (2015) The WOPR Domain Protein OsaA Orchestrates Development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **10**: e0137554.
- Allan, V.J. (2011) Cytoplasmic dynein. *Biochem Soc Trans* **39**: 1169–1178.
- Alshannaq, A. eta Yu, J.-H. (2017) Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health* **14**: 632.
- Andrianopoulos, A. eta 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.
- Araújo-Bazán, L., Dhingra, S., Chu, J., Fernández-Martínez, J., Calvo, A.M. eta Espeso, E.A. (2009) Importin α is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**: 506–515.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A. eta 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.
- Archer, D.B., Connerton, I.F. eta MacKenzie, D.A. (2008) Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids. In *Food Biotechnology*. Stahl, U., Donalies, U.E.B., and Nevoigt, E. (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 99–147.
- Arratia-Quijada, J., Sánchez, O., Scazzocchio, C. eta 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.
- Arratia, J. eta Aguirre, J. (2013) Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP* **16**: 98–108.

- Arribere, J.A., Cenik, E.S., Jain, N., Hess, G.T., Lee, C.H., Bassik, M.C. et al. Fire, A.Z. (2016) Translation readthrough mitigation. *Nature* **534**: 719–723.
- Axelrod, D.E., Gealt, M. et al. Pastushok, M. (1973) Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**: 9–15.
- Baltussen, T.J.H., Zoll, J., Verweij, P.E. et al. Melchers, W.J.G. (2020) Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* **84**: e00049-19.
- Barbosa, C., Peixeiro, I. et al. Romão, L. (2013) Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet* **9**: e1003529.
- Barlowe, C.K. et al. Miller, E.A. (2013) Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway. *Genetics* **193**: 383–410.
- Bartnicki-García, S. (2002) Hyphal tip growth: outstanding questions. *Mycol Ser* **15**: 29–58.
- Bayram, Ö. et al. Braus, G.H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1–24.
- Bayram, Ö., Braus, G.H., Fischer, R. et al. Rodriguez-Romero, J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**: 900–908.
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al. (2008) VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science (80- )* **320**: 1504–1506.
- Ben-Yaakov, K., Dagan, S.Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalanchi, D., Willis, D.E., et al. (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* **31**: 1350–1363.
- Berepiki, A., Lichius, A. et al. 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. et al. Takeshita, N. (2016) Dynamics of Actin Cables in Polarized Growth of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* **7**: 682.
- Bleichrodt, R.-J., Hulsman, M., Wösten, H.A.B. et al. Reinders, M.J.T. (2015) Switching from a Unicellular to Multicellular Organization in an *Aspergillus niger* Hypha. *MBio* **6**: e00111-15.
- Bourett, T.M. et al. Howard, R.J. (1996) Brefeldin A-induced structural changes in the endomembrane system of a filamentous fungus, *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **190**: 151–163.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M. et al. Peterson, C.L. (2002) Essential Role for the SANT Domain in the Functioning of Multiple Chromatin Remodeling Enzymes. *Mol Cell* **10**: 935–942.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Bravo-Plaza, I., Hernández-González, M., Pinar, M., Díaz, J.F. et al. Peñalva, M.A. (2019) Identification of the guanine nucleotide exchange factor for SAR1 in the filamentous fungal model *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1866**: 118551.
- Breakspear, A., Langford, K.J., Momany, M. et al. Assinder, S.J. (2007) CopA:GFP localizes to putative Golgi equivalents in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 90–97.

- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G. et al White, T.C. (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* **4**: 165rv13.
- Busby, T.M., Miller, K.Y. et al 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.
- Canty, J.T. et al Yildiz, A. (2020) Activation and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Trends Biochem Sci* **45**: 440–453.
- Carter, A.P., Diamant, A.G. et al Urnavicius, L. (2016) How dynein and dynactin transport cargos: a structural perspective. *Curr Opin Struct Biol* **37**: 62–70.
- Castro, F. De et al Bolker, B. (2005) Mechanisms of disease-induced extinction. *Ecol Lett* **8**: 117–126.
- Chambergo, F.S. et al Valencia, E.Y. (2016) Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 2567–2577.
- Chu, X.-L., Feng, M.-G. et al 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.
- Church, G.M. et al Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 1991–1995.
- Cianfrocco, M.A., DeSantis, M.E., Leschziner, A.E. et al Reck-Peterson, S.L. (2015) Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 83–108.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317–327.
- Cortese, M.S., Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A. et al Ugalde, U. (2011) Elucidation of Functional Markers from *Aspergillus nidulans* Developmental Regulator FlbB and Their Phylogenetic Distribution. *PLoS One* **6**: e17505.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta - Enzymol Biol Oxid* **113**: 51–56.
- D'Elia, T., Veerapaneni, R. et al Rogers, S.O. (2008) Isolation of Microbes from Lake Vostok Accretion Ice. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4962 LP – 4965.
- Dai, Z. (2019) Transcription Factors Indirectly Regulate Genes through Nuclear Colocalization. *Cells* **8**: 754.
- Damare, S. et al Raghukumar, C. (2008) Fungi and Macroaggregation in Deep-Sea Sediments. *Microb Ecol* **56**: 168–177.
- Dantigny, P. et al Nanguy, S.P.-M. (2009) Significance of the physiological state of fungal spores. *Int J Food Microbiol* **134**: 16–20.
- Dean, R., Kan, J.A.L. Van, Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A. Di, Spanu, P.D., et al. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 414–430.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D. et al Toledano, M.B. (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157–5166.
- Dienstbier, M. et al Li, X. (2009) Bicaudal-D and its role in cargo sorting by microtubule-based motors. *Biochem Soc Trans* **37**: 1066–1071.

- Duden, R. (2003) ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* **20**: 197–207.
- Dutton, J.R., Johns, S. eta Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16**: 5710–5721.
- Dyer, P.S. eta 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. (2002) 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. eta Morris, N.R. (2000) The Lis1-Related NudF Protein of *Aspergillus nidulans* Interacts with the Coiled-Coil Domain of the Nude/Ro11 Protein. *J Cell Biol* **150**: 681–688.
- Egan, M.J., McClintock, M.A. eta Reck-Peterson, S.L. (2012a) Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**: 637–645.
- Egan, M.J., Tan, K. eta Reck-Peterson, S.L. (2012b) Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol* **197**: 971–982.
- Emmerich, C.H. eta Cohen, P. (2015) Optimising methods for the preservation, capture and identification of ubiquitin chains and ubiquitylated proteins by immunoblotting. *Biochem Biophys Res Commun* **466**: 1–14.
- Etxebeste, O. eta Espeso, E.A. (2020) *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *Int Microbiol* **23**: 5–22.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A. eta Ugalde, U. (2010a) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569–576.
- Etxebeste, O., Herrero-García, E., Araújo-Bazán, L., Rodríguez-Urra, A.B., Garzia, A., Ugalde, U. eta 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., Oiartzabal-Arano, E., los Ríos, V. de, *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. eta 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*. *Eukaryot Cell* **7**: 38–48.
- Etxebeste, O., Otamendi, A., Garzia, A., Espeso, E.A. eta Cortese, M.S. (2019) Rewiring of transcriptional networks as a major event leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi. *Crit Rev Microbiol* **45**: 548–563.
- Etxebeste, O., Ugalde, U. eta 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., Araújo-Bazán, L. eta 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., Peñalva, M.Á. eta 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.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.-K., Dijck, P. van, Vries, R. de, Ruijter, G., Thevelein, J. eta D'Enfert, C. (2001) Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **147**: 1851–1862.
- Fischer, R. eta Kües, U. (2006) Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. In *The Mycota: Growth, Differentiation and Sexuality*. Kües, U., and Fischer, R. (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 263–292.
- Fischer, R., Zekert, N. eta Takeshita, N. (2008) Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**: 813–826.
- Fisher, M.C., Gurr, S.J., Cuomo, C.A., Blehert, D.S., Jin, H., Stukenbrock, E.H., *et al.* (2020) Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *MBio* **11**: e00449-20.
- Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D. eta Gurr, S.J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **360**: 739–742.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L. eta Gurr, S.J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186–194.
- Fontes, M.R.M., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I. eta Kobe, B. (2003) Structural Basis for the Specificity of Bipartite Nuclear Localization Sequence Binding by Importin- $\alpha$ . *J Biol Chem* **278**: 27981–27987.
- Futagami, T., Nakao, S., Kido, Y., Oka, T., Kajiwara, Y., Takashita, H., *et al.* (2011) Putative stress sensors WscA and WscB are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress tolerance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **10**: 1504–1515.
- Gabora, L. (2013) Convergent Evolution. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Academic Press, pp. 178–180.
- Gadd, G.M. (2017) The Geomycology of Elemental Cycling and Transformations in the Environment. *Microbiology Spectrum* **5**: 369–386.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglu, 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. eta 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. eta 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. eta 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.
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. eta Strahl-Bolsinger, S. (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**: 19288–19296.

- Glass, N.L., Rasmussen, C., Roca, M.G. eta Read, N.D. (2004) Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol* **12**: 135–141.
- Glick, B.S. eta Nakano, A. (2009) Membrane Traffic Within the Golgi Apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 113–132.
- Golan, J.J. eta Pringle, A. (2017) Long-Distance Dispersal of Fungi. *Microbiology Spectrum* **5**: 309–333.
- Goto, M., Harada, Y., Oka, T., Matsumoto, S., Takegawa, K. eta Furukawa, K. (2009) Protein O-Mannosyltransferases B and C Support Hyphal Development and Differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1465–1474.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R. eta Hofacker, I.L. (2008) The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res* **36**: 70–74.
- Guo, X., Farías, G.G., Mattera, R. eta Bonifacino, J.S. (2016) Rab5 and its effector FHF contribute to neuronal polarity through dynein-dependent retrieval of somatodendritic proteins from the axon. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E5318–E5327.
- Han, K.-H., Han, K.-Y., Yu, J.-H., Chae, K.-S., Jahng, K.-Y. eta Han, D.-M. (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**: 299–309.
- Han, K.-H., Lee, D.-B., Kim, J.-H., Kim, M.-S., Han, K.-Y., Kim, W.-S., et al. (2003) Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **41**: 34–40.
- Han, S. eta Adams, T. (2001) Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **266**: 260–270.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R.A. eta Adams, T.H. (1993) Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12**: 2449–2457.
- Hanz, S. eta Fainzilber, M. (2006) Retrograde signaling in injured nerve – the axon reaction revisited. *J Neurochem* **99**: 13–19.
- 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.
- Harreman, M.T., Cohen, P.E., Hodel, M.R., Truscott, G.J., Corbett, A.H. eta Hodel, A.E. (2003a) Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha. *J Biol Chem* **278**: 21361–21369.
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E. eta Corbett, A.H. (2003b) The auto-inhibitory function of importin alpha is essential *in vivo*. *J Biol Chem* **278**: 5854–5863.
- Harris, S.D. (2011) Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biol* **115**: 475–484.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. eta Momany, M. (2005) Polarisome Meets Spitzenkörper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225–229.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. eta Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**: 733–736.
- Hernández-González, M., Peñalva, M.A. eta Pantazopoulou, A. (2015) Conditional inactivation of *Aspergillus nidulans sarA<sup>SAR1</sup>* uncovers the morphogenetic potential of regulating endoplasmic reticulum (ER) exit. *Mol Microbiol* **95**: 491–508.



- 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. eta 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.
- Hichri, I., Deluc, L., Barrieu, F., Bogs, J., Mahjoub, A., Regad, F., *et al.* (2011) A single amino acid change within the R2 domain of the VvMYB5b transcription factor modulates affinity for protein partners and target promoters selectivity. *BMC Plant Biol* **11**: 117.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. eta Fischer, R. (2009) The Cell End Marker Protein TeaC Is Involved in Growth Directionality and Septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**: 957–967.
- Hirokawa, N., Niwa, S. eta Tanaka, Y. (2010) Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* **68**: 610–638.
- Hodel, M.R., Corbett, A.H. eta Hodel, A.E. (2001) Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem* **276**: 1317–25.
- Hood, H.M., Neafsey, D.E., Galagan, J. eta Sachs, M.S. (2009) Evolutionary Roles of Upstream Open Reading Frames in Mediating Gene Regulation in Fungi. *Annu Rev Microbiol* **63**: 385–409.
- Hoogenraad, C.C., Wulf, P., Schiefermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, J.V., *et al.* (2003) Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *EMBO J* **22**: 6004–6015.
- Horio, T. (2007) Role of microtubules in tip growth of fungi. *J Plant Res* **120**: 53–60.
- Horio, T. eta Oakley, B.R. (2004) The Role of Microtubules in Rapid Hyphal Tip Growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 918–926.
- Htet, Z.M., Gillies, J.P., Baker, R.W., Leschziner, A.E., DeSantis, M.E. eta Reck-Peterson, S.L. (2020) LIS1 promotes the formation of activated cytoplasmic dynein-1 complexes. *Nat Cell Biol* **22**: 518–525.
- Huang, J., Roberts, A.J., Leschziner, A.E. eta Reck-Peterson, S.L. (2012) Lis1 Acts as a “Clutch” between the ATPase and Microtubule-Binding Domains of the Dynein Motor. *Cell* **150**: 975–986.
- Huang, L., Li, X., Dong, L., Wang, B. eta Pan, L. (2019) Profiling of chromatin accessibility across *Aspergillus* species and identification of transcription factor binding sites in the *Aspergillus* genome using filamentous fungi ATAC-seq. *bioRxiv* 857284.
- Huang, M. eta Hull, C.M. (2017) Sporulation: how to survive on planet Earth (and beyond). *Curr Genet* **63**: 831–838.
- Ilari, A. eta Savino, C. (2017) A Practical Approach to Protein Crystallography. In *Bioinformatics: Volume I: Data, Sequence Analysis, and Evolution*. Keith, J.M. (ed.). Springer New York, New York, NY. pp. 47–78.
- Iradi-Serrano, M., Tola-García, L., Cortese, M.S. eta Ugalde, U. (2019) The early asexual development regulator *fluG* codes for a putative bifunctional enzyme. *Front Microbiol* **10**: 778.
- Ishitsuka, Y., Savage, N., Li, Y., Bergs, A., Grün, N., Kohler, D., *et al.* (2015) Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. *Sci Adv* **1**: e1500947–e1500947.

- Johnson, A.J. (2016) Artisanal food microbiology. *Nat Microbiol* **1**: 16039.
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. eta Caplan, S. (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **25**: 99–112.
- Käfer, E. (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217–232.
- Kaiser, P. eta Huang, L. (2005) Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol* **6**: 233.
- Kardon, J.R. eta Vale, R.D. (2009) Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 854–865.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. eta Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**: 845–858.
- Kim, H.-S., Han, K.-Y., Kim, K.-J., Han, D.-M., Jahng, K.-Y. eta Chae, K.-S. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 72–80.
- King, S.J. eta Schroer, T.A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* **2**: 20–24.
- Koley, S., Rozenbaum, M., Fainzilber, M. eta Terenzio, M. (2019) Translating regeneration: Local protein synthesis in the neuronal injury response. *Neurosci Res* **139**: 26–36.
- Krämer, H. eta Phistry, M. (1996) Mutations in the *Drosophila* hook gene inhibit endocytosis of the boss transmembrane ligand into multivesicular bodies. *J Cell Biol* **133**: 1205–1215.
- Kriangkripipat, T. eta Momany, M. (2009) *Aspergillus nidulans* protein *O*-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot Cell* **8**: 1475–1485.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. eta Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**: 1547–1549.
- Kutay, U. eta Güttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* **15**: 121–124.
- Kwon, N.-J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U. eta Yu, J.-H. (2010) FlbC is a putative nuclear C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203–1219.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lafon, A., Han, K.-H., Seo, J.-A., Yu, J.-H. eta D'Enfert, C. (2006) G-protein and cAMP-mediated signaling in *Aspergilli*: A genomic perspective. *Fungal Genet Biol* **43**: 490–502.
- Lafon, A., Seo, J.-A., Han, K.-H., Yu, J.-H. eta D'Enfert, C. (2005) The Heterotrimeric G-Protein GanB(α)-SfaD(β)-GpgA(γ) Is a Carbon Source Sensor Involved in Early cAMP-Dependent Germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 71–80.
- Le, T.H.T., Oki, A., Goto, M. eta Shimizu, K. (2018) Protein *O*-mannosyltransferases are required for sterigmatocystin production and developmental processes in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **64**: 1043–1056.
- Lee, B.N. eta 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. eta 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. eta 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. eta Yu, J.-H. (2016) Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep* **6**: 28874.
- Letunic, I. eta Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **47**: W256–W259.
- Li, Z., Schulz, M.H., Look, T., Begemann, M., Zenke, M. eta Costa, I.G. (2019) Identification of transcription factor binding sites using ATAC-seq. *Genome Biol* **20**: 45.
- Lommel, M. eta Strahl, S. (2009) Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**: 816–828.
- Lott, K. eta Cingolani, G. (2011) The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1813**: 1578–1592.
- Markina-Iñarrairaegui, A., Etxebeste, O., Herrero-García, 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.
- Markina-Iñarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E.A. eta Peñalva, M.A. (2013) The *Aspergillus nidulans* Peripheral ER: Disorganization by ER Stress and Persistence during Mitosis. *PLoS One* **8**: e67154.
- Marshall, M.A. eta Timberlake, W.E. (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**: 55–62.
- Martinelli, S.D. eta Clutterbuck, A.J. (1971) A Quantitative Survey of Conidiation Mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **69**: 261–268.
- Mayran, A., Sochodolsky, K., Khetchoumian, K., Harris, J., Gauthier, Y., Bemmo, A., et al. (2019) Pioneer and nonpioneer factor cooperation drives lineage specific chromatin opening. *Nat Commun* **10**: 3807.
- McDonald, M.J., Rice, D.P. eta Desai, M.M. (2016) Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. *Nature* **531**: 233–236.
- McKenney, R.J., Huynh, W., Tanenbaum, M.E., Bhabha, G. eta Vale, R.D. (2014) Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science* **345**: 337–341.
- Mims, C.W., Richardson, E.A. eta Timberlake, W.E. (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **144**: 132–141.
- Mironov, A.A. eta Pavelka, M. (2008) The Golgi apparatus as a crossroads in intracellular traffic. In *The Golgi Apparatus*. Springer Vienna, pp. 16–39.
- Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., et al. (2019) InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res* **47**: 351–360.
- Momany, M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes.

*Curr Opin Microbiol* **5**: 580–585.

Mooney, J.L. eta Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473–1482.

Morton, A.G. (1961) The induction of sporulation in mould fungi. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* **153**: 548–569.

Munro, S. (2011) Q&A: What is the Golgi apparatus, and why are we asking? *BMC Biol* **9**: 63.

Nagy, L.G. (2017) Evolution: Complex Multicellular Life with 5,500 Genes. *Curr Biol* **27**: 609–612.

Nagy, L.G., Kovács, G.M. eta Krizsán, K. (2018) Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both? *Biol Rev* **93**: 1778–1794.

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**: 1557–66.

Ni, M. eta Yu, J.-H. (2007) A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**: e970.

Noble, L.M. eta Andrianopoulos, A. (2013) Reproductive competence: a recurrent logic module in eukaryotic development. *Proc R Soc B Biol Sci* **280**: 20130819.

Nocedal, I. eta Johnson, A.D. (2015) How Transcription Networks Evolve and Produce Biological Novelty. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **80**: 265–274.

Noventa-Jordão, M.A., Nascimento, A.M. do, Goldman, M.H.S., Terenzi, H.F. eta Goldman, G.H. (2000) Molecular characterization of ubiquitin genes from *Aspergillus nidulans*: mRNA expression on different stress and growth conditions. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* **1490**: 237–244.

Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., et al. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**: 639–648.

Oiartzabal-Arano, E., Garzia, A., Gorostidi, A., Ugalde, U., Espeso, E.A. eta 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. eta Etxebeste, O. (2016) Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **62**: 371–377.

Oka, M. eta Yoneda, Y. (2018) Importin  $\alpha$ : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Japan Acad Ser B* **94**: 259–274.

Oshero, N. eta May, G. (2000) Conidial Germination in *Aspergillus nidulans* Requires RAS Signaling and Protein Synthesis. *Genetics* **155**: 647–656.

Otamendi, A., Espeso, E.A. eta Etxebeste, O. (2019a) Identification and Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Impaired in Asexual Development under Phosphate Stress. *Cells* **8**.

Otamendi, A., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Oiartzabal-Arano, E., Cortese, M.S., Espeso, E.A. eta Etxebeste, O. (2019b) Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB. *Cell Mol Life Sci* **76**: 4369–4390.

Otis, K.O., Thompson, K.R. eta Martin, K.C. (2006) Importin-mediated nuclear transport in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 329–335.

- Panayotis, N., Karpova, A., Kreutz, M.R. et al Fainzilber, M. (2015) Macromolecular transport in synapse to nucleus communication. *Trends Neurosci* **38**: 108–116.
- Pandit, S., Lohmar, J., Ahmed, S., Etxebeste, O., Espeso, E. et al Calvo, A. (2018) UrdA Controls Secondary Metabolite Production and the Balance between Asexual and Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Genes (Basel)* **9**: 570.
- Pantazopoulou, A. (2016) The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi. *Mycologia* **108**: 603–622.
- Pantazopoulou, A. et al 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. et al 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.
- Park, H.-S., Lee, M.-K., Han, K.-H., Kim, M.-J. et al Yu, J.-H. (2019) Developmental Decisions in *Aspergillus nidulans*. In *The Mycota: Biology of the Fungal Cell*. Hoffmeister, D., and Gressler, M. (eds). Springer International Publishing, pp. 63–80.
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K.C., Kim, Y.H. et al Yu, J.-H. (2012) The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e45935.
- Park, H.-S. et al Yu, J.-H. (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**: 669–677.
- Pemán, J. et al Quindós, G. (2014) Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol* **31**: 213–218.
- Peñalva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963–975.
- Peñalva, M.Á. (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**: 684–692.
- Peñalva, M.A., Zhang, J., Xiang, X. et al 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* **28**: 947–961.
- Perez-de-Nanclares-Arregi, E. et al Etxebeste, O. (2014) Photo-convertible tagging for localization and dynamic analyses of low-expression proteins in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **70**: 33–41.
- Perry, R.B.-T. et al Fainzilber, M. (2009) Nuclear transport factors in neuronal function. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 600–606.
- Picazo, I., Etxebeste, O., Requena, E., Garzia, A., et al Espeso, E.A. (2020) Defining the transcriptional responses of *Aspergillus nidulans* to cation/alkaline pH stress and the role of the transcription factor SltA. *Microb Genomics* **6**: e000415.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst Jr, H.N. et al Peñalva, M.A. (2013) 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.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D. et al Bufton, A.W.J. (1953) The Genetics of *Aspergillus nidulans*. In *Advances in Genetics*. Academic Press, pp. 141–238.

- Popchock, A.R., Tseng, K.-F., Wang, P., Karplus, P.A., Xiang, X. eta Qiu, W. (2017) The mitotic kinesin-14 KlpA contains a context-dependent directionality switch. *Nat Commun* **8**: 13999.
- Prade, R.A. eta Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**: 2439–2447.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E.A., et al. (2008) Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**: 255–259.
- Qiu, R., Zhang, J. eta Xiang, X. (2018) p25 of the dynactin complex plays a dual role in cargo binding and dynactin regulation. *J Biol Chem* **293**: 15606–15619.
- Qiu, R., Zhang, J. eta Xiang, X. (2019) LIS1 regulates cargo-adapter-mediated activation of dynein by overcoming its autoinhibition *in vivo*. *J Cell Biol* **218**: 3630–3646.
- Ramirez, J., Min, M., Barrio, R., Lindon, C. eta Mayor, U. (2016) Isolation of Ubiquitinated Proteins to High Purity from *In Vivo* Samples. In *Proteostasis: Methods and Protocols*. Matthiesen, R. (ed.). Springer New York, pp. 193–202.
- Reck-Peterson, S.L., Redwine, W.B., Vale, R.D. eta Carter, A.P. (2018) The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**: 382–398.
- Reck-Peterson, S.L., Yildiz, A., Carter, A.P., Gennerich, A., Zhang, N. eta Vale, R.D. (2006) Single-Molecule Analysis of Dynein Processivity and Stepping Behavior. *Cell* **126**: 335–348.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyms, W.B., et al. (1993) Isolation of a Miller–Dicker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature* **364**: 717–721.
- Reiser, K., Davis, M.A. eta Hynes, M.J. (2010) AoxA is a major peroxisomal long chain fatty acyl-CoA oxidase required for  $\beta$ -oxidation in *A. nidulans*. *Curr Genet* **56**: 139–150.
- Riquelme, M. (2013) Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. *Annu Rev Microbiol* **67**: 587–609.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., et al. (2018) Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol Mol Biol Rev* **82**: e00068-17.
- Rishal, I. eta Fainzilber, M. (2014) Axon–soma communication in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **15**: 32–42.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., eta Mesirov, J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24–26.
- Rodrigues, C.H.M., Pires, D.E. V eta Ascher, D.B. (2018) DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res* **46**: 350–355.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S. eta 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. eta Ugalde, U. (2012) Signaling the Induction of Sporulation Involves the Interaction of Two Secondary Metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* **7**: 599–606.
- Rosén, S., Yu, J.H. eta Adams, T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**: 5592–

5600.

Ruger-Herrerros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M. eta Canovas, D. (2011) Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**: 809–822.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. eta Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., et al. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* **78**: 141–173.

Sanati Nezhad, A. eta Geitmann, A. (2013) The cellular mechanics of an invasive lifestyle. *J Exp Bot* **64**: 4709–4728.

Scazzocchio, C. (2009) *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. In *Encyclopedia of Microbiology*. Schaechter, M.B.T.-E. of M. (Third E. (ed.). Academic Press, pp. 401–421.

Schlager, M.A., Hoang, H.T., Urnavicius, L., Bullock, S.L. eta Carter, A.P. (2014) *In vitro* reconstitution of a highly processive recombinant human dynein complex. *EMBO J* **33**: 1855–1868.

Schnell, J.D. eta Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**: 35857–35860.

Schroeder, C.M. eta Vale, R.D. (2016) Assembly and activation of dynein–dynactin by the cargo adaptor protein Hook3. *J Cell Biol* **214**: 309–318.

Seo, J.-A., Guan, Y. eta Yu, J.-H. (2006) FluG-Dependent Asexual Development in *Aspergillus nidulans* Occurs via Derepression. *Genetics* **172**: 1535–1544.

Setlow, P. (2014a) Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr* **2**: 1–14.

Setlow, P. (2014b) Germination of Spores of Bacillus Species: What We Know and Do Not Know. *J Bacteriol* **196**: 1297 LP – 1305.

Sewall, T.C., Mims, C.W. eta Timberlake, W.E. (1990a) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**: 731–739.

Sewall, T.C., Mims, C.W. eta Timberlake, W.E. (1990b) Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev Biol* **138**: 499–508.

Sharpless, K.E. eta Harris, S.D. (2002) Functional Characterization and Localization of the *Aspergillus nidulans* Formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13**: 469–479.

Shaw, B.D., Chung, D.-W., Wang, C.-L., Quintanilla, L.A. eta Upadhyay, S. (2011) A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol* **115**: 541–546.

Shimizu, K. eta Keller, N.P. (2001) Genetic Involvement of a cAMP-Dependent Protein Kinase in a G Protein Signaling Pathway Regulating Morphological and Chemical Transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**: 591–600.

Skromne, I., Sanchez, O. eta Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21–28.

Soid-Raggi, G., Sánchez, O. eta Aguirre, J. (2006) TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **59**: 854–869.

- Soid-Raggi, G., Sánchez, O., Ramos-Balderas, J.L. eta Aguirre, J. (2016) The Adenylate-Forming Enzymes AfeA and TmpB Are Involved in *Aspergillus nidulans* Self-Communication during Asexual Development. *Front Microbiol* **7**: 353.
- Spitz, F. eta Furlong, E.E.M. (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* **13**: 613–626.
- Splinter, D., Razafsky, D.S., Schlager, M.A., Serra-Marques, A., Grigoriev, I., Demmers, J., et al. (2012) BICD2, dynactin, and LIS1 cooperate in regulating dynein recruitment to cellular structures. *Mol Biol Cell* **23**: 4226–4241.
- Steinberg, G. (2011) Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr Opin Microbiol* **14**: 660–667.
- Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L. eta Calvo, A.M. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin  $\alpha$  carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**: 242–255.
- Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C. eta Timberlake, W.E. (1991) *Rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* **5**: 1161–1171.
- 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.
- Tabb, M.M., Tongaonkar, P., Vu, L. eta Nomura, M. (2000) Evidence for Separable Functions of Srp1p, the Yeast Homolog of Importin  $\alpha$  (Karyopherin  $\alpha$ ): Role for Srp1p and Sts1p in Protein Degradation. *Mol Cell Biol* **20**: 6062–6073.
- 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. eta 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.
- Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., et al. (2002) Mechanism of c-Myb $\beta$  Cooperation from Separated Sites on a Promoter. *Cell* **108**: 57–70.
- Takeshita, N. (2016) Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 1693–1699.
- Takeshita, N., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R.A., Lu, L., et al. (2017) Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc Natl Acad Sci* **114**: 5701–5706.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. eta Fischer, R. (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 339–351.
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., Vega, S.H. de eta Fischer, R. (2014) Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**: 34–41.
- Tang, W., Ru, Y., Hong, L., Zhu, Q., Zuo, R., Guo, X., et al. (2015) System-wide characterization of bZIP transcription factor proteins involved in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Environ Microbiol* **17**: 1377–1396.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. eta Davies, R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205–221.
- Tiley, A.M.M., Foster, G.D. eta Bailey, A.M. (2018) Exploring the Genetic Regulation of Asexual



- Sporulation in *Zymoseptoria tritici*. *Front Microbiol* **9**: 1859.
- Timberlake, W.E. (1991) Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr Opin Genet Dev* **1**: 351–357.
- Todd, R.B., Davis, M.A. eta Hynes, M.J. (2007a) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* **2**: 811–821.
- Todd, R.B., Davis, M.A. eta Hynes, M.J. (2007b) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2**: 822–830.
- Torisawa, T., Ichikawa, M., Furuta, A., Saito, K., Oiwa, K., Kojima, H., et al. (2014) Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nat Cell Biol* **16**: 1118–1124.
- Treseder, K.K. eta Lennon, J.T. (2015) Fungal Traits That Drive Ecosystem Dynamics on Land. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 243–262.
- Tutar, Y. eta Harman, J.G. (2006) Effect of salt bridge on transcription activation of CRP-dependent lactose operon in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **453**: 217–223.
- Upadhyay, S. eta Shaw, B.D. (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68**: 690–705.
- Urnavicius, L., Lau, C.K., Elshenawy, M.M., Morales-Rios, E., Motz, C., Yildiz, A. eta Carter, A.P. (2018) Cryo-EM shows how dynactin recruits two dyneins for faster movement. *Nature* **554**: 202–206.
- Urnavicius, L., Zhang, K., Diamant, A.G., Motz, C., Schlager, M.A., Yu, M., et al. (2015) The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science* **347**: 1441–1446.
- Vale, R.D. (2003) The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell* **112**: 467–480.
- Vilela, C., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C. eta McCarthy, J.E.G. (1998) The yeast transcription factor genes YAP1 and YAP2 are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res* **26**: 1150–1159.
- Vilela, C. eta McCarthy, J.E.G. (2003) Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol Microbiol* **49**: 859–867.
- Virag, A., Lee, M.P., Si, H. eta Harris, S.D. (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **66**: 1579–1596.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D. eta Powers, D.W. (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**: 897–900.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**: 296–303.
- Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D. eta Hou, T. (2019) HawkDock: a web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Res* **47**: 322–W330.
- Wickstead, B. eta Gull, K. (2007) Dyneins Across Eukaryotes: A Comparative Genomic Analysis. *Traffic* **8**: 1708–1721.
- Wieser, J. eta 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.W. eta Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**: 62–69.
- Willins, D.A., Liu, B., Xiang, X. eta Morris, N.R. (1997) Mutations in the heavy chain of cytoplasmic dynein suppress the *nudF* nuclear migration mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet MGG* **255**: 194–200.
- Wyatt, T.T., Wösten, H.A.B. eta Dijksterhuis, J. (2013) Chapter Two - Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. In Sariaslani, S., and Gadd, G.M.B.T.-A. in A.M. (eds). Academic Press, pp. 43–91.
- Xiang, X., Beckwith, S.M. eta Morris, N.R. (1994) Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 2100–2104.
- Xiang, X. eta Fischer, R. (2004) Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 411–419.
- Xiang, X., Osmani, A.H., Osmani, S.A., Roghi, C.H., Willins, D.A., Beckwith, S., et al. (1995a) Analysis of nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 813–819.
- Xiang, X., Osmani, A.H., Osmani, S.A., Xin, M. eta Morris, N.R. (1995b) NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**: 297–310.
- Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst, H.N., Peñalva, M.A. eta Zhang, J. (2015) Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cell Mol Life Sci* **72**: 3267–3280.
- Xiang, X., Roghi, C. eta Morris, N.R. (1995c) Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 9890–9894.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., Souza, C.P.C. De, 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.
- Yao, X., Wang, X. eta Xiang, X. (2014) FHIP and FTS proteins are critical for dynein-mediated transport of early endosomes in *Aspergillus*. *Mol Biol Cell* **25**: 2181–2189.
- Yao, X., Zhang, J., Zhou, H., Wang, E. eta Xiang, X. (2012) *In Vivo* Roles of the Basic Domain of Dynactin p150 in Microtubule Plus-End Tracking and Dynein Function. *Traffic* **13**: 375–387.
- 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. eta Seo, J.-A. (2006) Growth and Developmental Control in the Model and Pathogenic *Aspergilli*. *Eukaryot Cell* **5**: 1577–1584.
- Yu, J.H., Wieser, J. eta Adams, T.H. (1996) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**: 5184–5190.
- Zarnack, K. eta Feldbrügge, M. (2007) mRNA trafficking in fungi. *Mol Genet Genomics* **278**: 347–359.
- Zarnack, K. eta Feldbrügge, M. (2010) Microtubule-Dependent mRNA Transport in Fungi. *Eukaryot Cell* **9**: 982–990.

Zhang, J., Li, S., Fischer, R. eta 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 Jr., H.N., Peñalva, M.A. eta 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., Yao, X., Fischer, L., Abenza, J.F., Peñalva, M.A. eta Xiang, X. (2011) The p25 subunit of the dynactin complex is required for dynein–early endosome interaction. *J Cell Biol* **193**: 1245–1255.

Zhang, K., Foster, H.E., Rondelet, A., Lacey, S.E., Bahi-Buisson, N., Bird, A.W. eta Carter, A.P. (2017) Cryo-EM Reveals How Human Cytoplasmic Dynein Is Auto-inhibited and Activated. *Cell* **169**: 1303–1314.

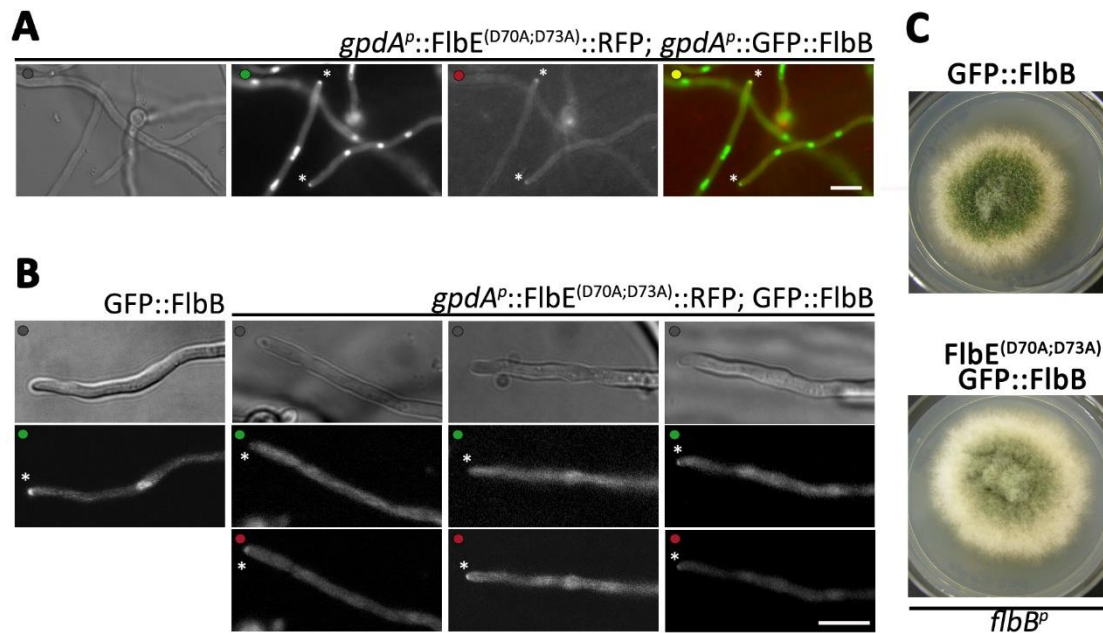
Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M. eta Helms, V. (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1808**: 912–924.



## **7. KAPITULUA: Eranskinak**

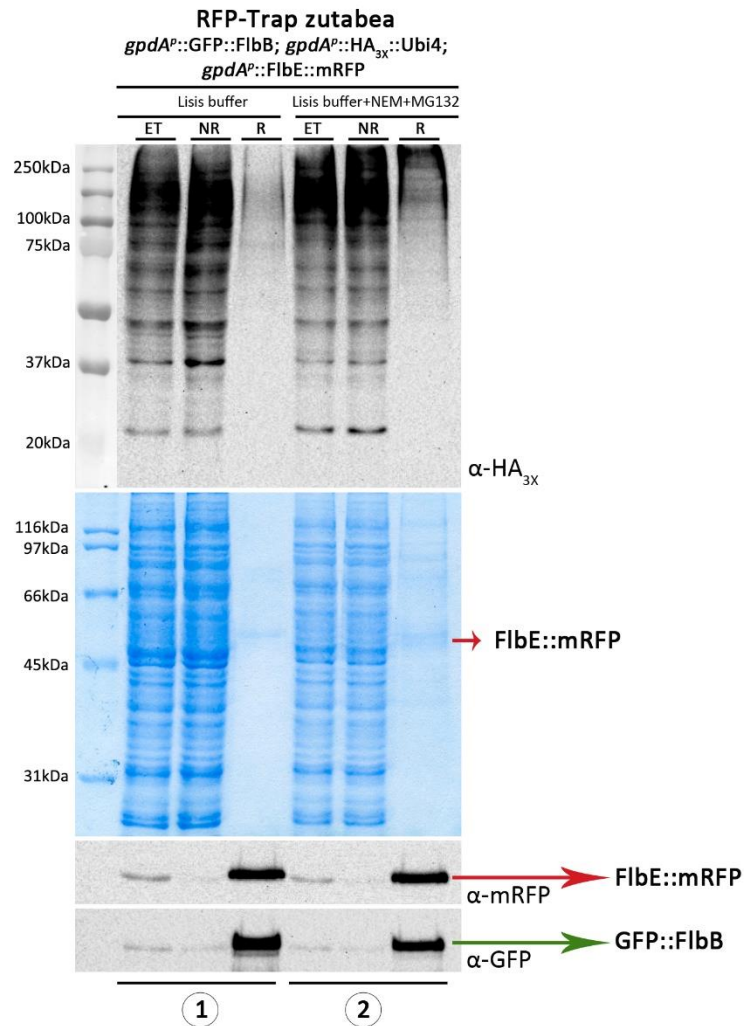


## 3.1. ERANSKINA



**3.1. Eranskina: FlbE-ren D70A;D73A mutazioen eraginaren azterketa.** A) (Otamendi *et al.*, 2019b) artikulutik hartu eta moldatutako irudiak.  $gpdA^p::FlbE^{(D70A;D73A)}::mRFP; gpdA^p::GFP::FlbB$  kimerak aldi berean adierazten zituen anduiaren (Elixabete Perez de Nanclares doktoreak sortua) hifen fluoreszentzia irudiak erakusten dira.  $FlbE^{(D70A;D73A)}$  fondo genetikoan, FlbB nahiz FlbE konstitutiboki adieraztean, bi kimerekin ez zuten lokalizazio apikala guztiz galtzen, ahulduta egon arren. Alabaina, mutante hau akonidiala zen (ez erakutsia). B) Fluoreszentzia mikroskopia irudiak kontrol  $GFP::FlbB$  anduiak eta  $gpdA^p::FlbE^{(D70A;D73A)}::mRFP; GFP::FlbB$  kimerak adierazten dituen mutanteaz. Bi kasuetan  $GFP::FlbB$   $flbB^p$  promotoreaz adierazten zen. Hala egitean, eta aipatutako  $flbE^-$  fondo genetikoan, fluoreszentzia maila oso baxua zen. Irudi bakan batzutan ezik (azken zutabea), ezin izan zen FlbB puntan detektatu. Kasu guztietan lokalizazio nuklearraren galera ikusi zen. FlbE proteina bera ere, nahiz eta konstitutiboki adierazi, fluoreszentzia maila oso baxuan detektatu zen puntan. C) Erreferentzia  $flbB^p::GFP::FlbB$  anduiarekin batera,  $gpdA^p::FlbE^{(D70A;D73A)}::mRFP; flbB^p::GFP::FlbB$  kimerak adierazten dituen anduiaren fenotipoak medio solidoz betetako 5.5 cm-ko Petri plaketa 37 °C-tan eta 72 orduz hazi ostean.  $FlbE^{(D70A;D73A)}::mRFP$  fondo genetikoan  $GFP::FlbB$  promotore natiboaz adieraztean ere, konidiazio gaitasuna nabarmenki kaltetu zen.

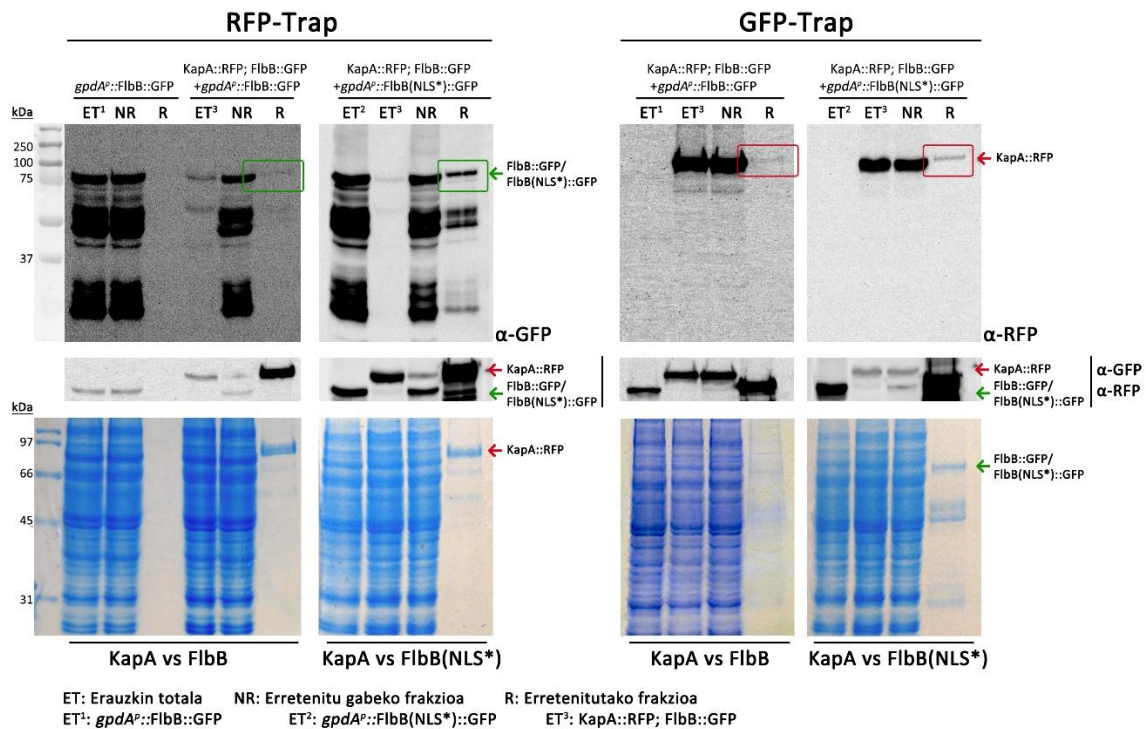
## 3.2.ERANSKINA



**3.2. Eranskina: FlbE-ren ustezko ubikitinazioaren azterketa.** FlbE-ren ustezko ubikitinazioa (Chu *et al.*, 2016) aztertzeko, (Ramirez *et al.*, 2016) lanean oinarrituz burutu ziren *pull-down* entseguak erakusten dira. Hauetan, GFP::FlbB, HA<sub>3X</sub>::Ubi4 eta FlbE::mRFP kimerak aldi berean eta hiruak *gpdA<sup>P</sup>* promotorepean adierazten zituen anduiaren proteina erauzkin totala erabili zen, RFP-Trap® erretxina komertzialarekin batera. Bi entsegu burutu ziren: 1) ohiko protokoloa jarraituz (ikus Materialak eta Metodoak kapituluan, 9.2.2. atala); eta 2) proteina erauzketarako eta zutabearen garbiketarako lisi *buffer*-ari 50 mM NEM eta 2  $\mu$ M MG132 gehituz (Emmerich eta Cohen, 2015). NEM konposatua desubikitinazioa ekiditeko erabili zen, eta MG132 proteosoma inhibitzailea ubikitinatutako proteinak ez degradatzeko. mRFP etiketari esker FlbE erretxinera lotu zen amu gisa (*Coomassie*-z tindatutako gelean eta  $\alpha$ -mRFP antigorputzaz burututako *Western-blot*-an ikus daitekeen bezala). Kontrol positibo gisa, GFP-ren immunodetekzioz, FlbB proteina frakzio erretenituan aurkitzen zela baieztatu zen. Bada,  $\alpha$ -HA<sub>3X</sub> antigorputzez egindako *Western-blot*-ean frakzio erretenituari erreparatuz gero, ez zen poliubikitinazio edo monoubikitinazioaz ikustea espero zen *smear* edo banda guztiz adierazgarririk detektatu, hurrenez hurren. Alabaina kontrolaren frakzio erretenituaren aldean badirudi seinaleren bat ikus daitekeela. Akaso ubikitinatu litezkeen FlbE-ren interaktoreei legokiekeen arrastoa izan daiteke. (ET) proteina erauzkin totala; (NR) erretenitu gabeko frakzioa eta (R) erretenitutako frakzioa.

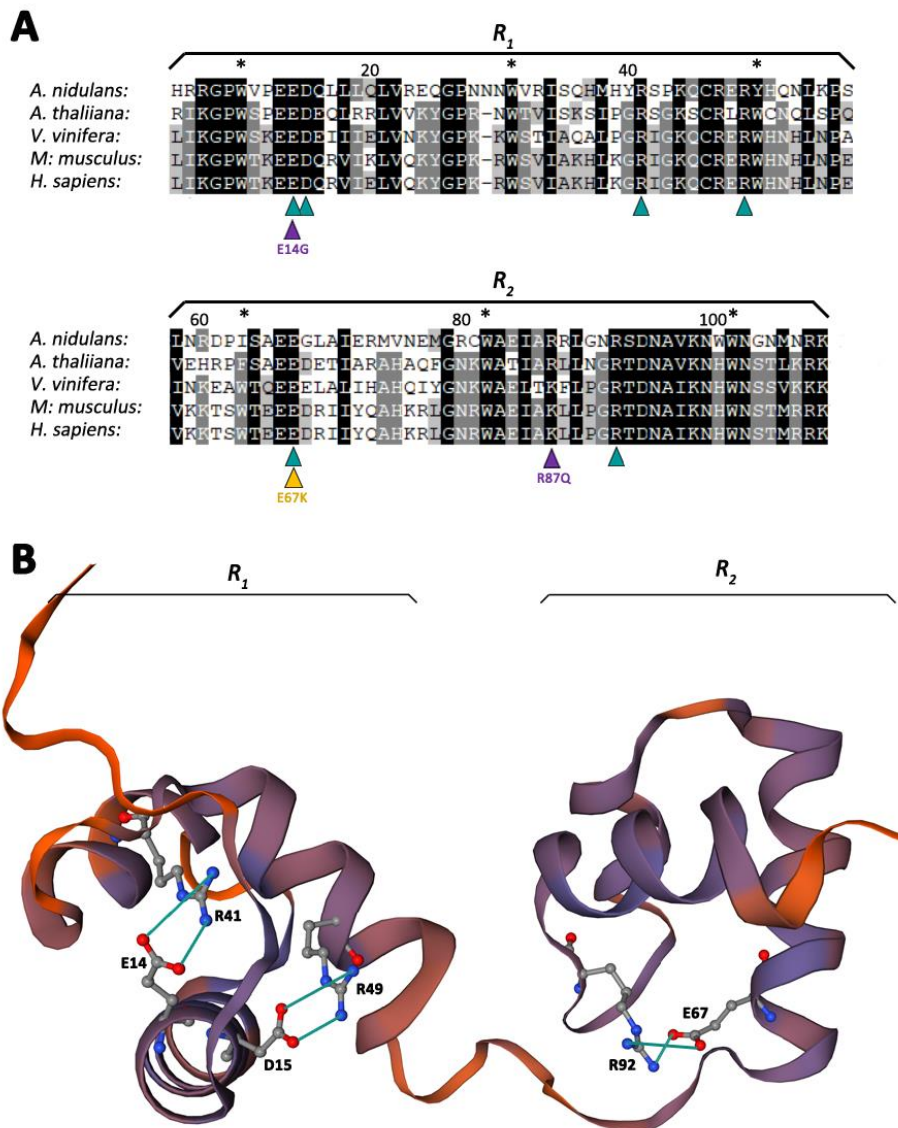


## 4.1. ERANSKINA



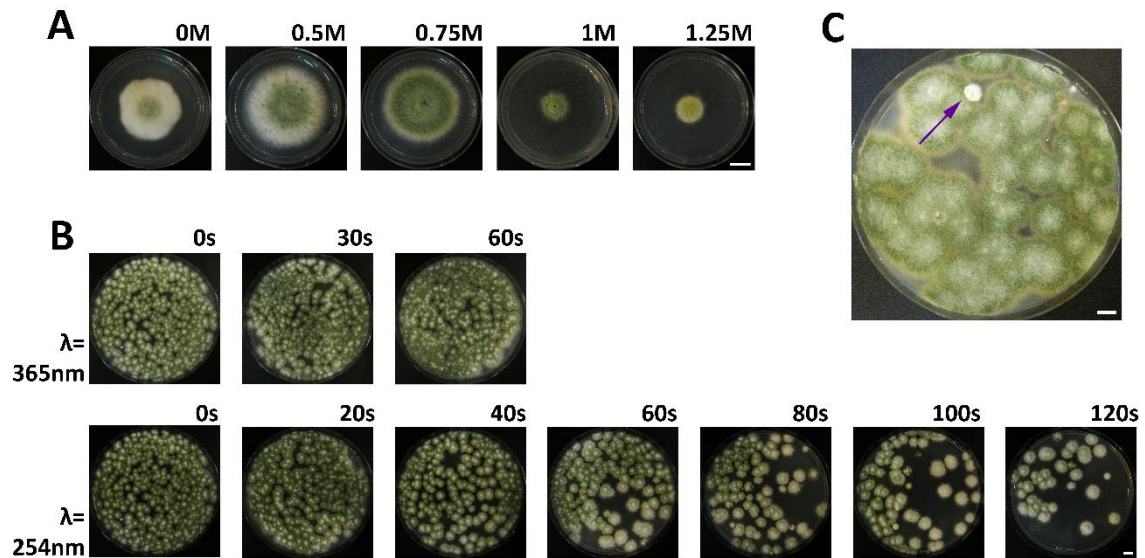
**RFP-Trap<sup>®</sup> eta GFP-Trap<sup>®</sup> zutabeaz pull-down entseguak KapA::mRFP eta FlbB::GFP kimeren artean.** Ezkerraldean RFP-Trap<sup>®</sup> zutabeaz eginiko entseguak aurkitzen dira. KapA::mRFP amu gisa erabilia, honek FlbB::GFP (edo honen NLS\* aldaera mutata) erreteni zezakeen aztertu nahi zen GFP-ren immunodetekzioz. Lehen lagin hirukotea kontrol probari dagokio (ET: proteina erauzkin totala; NR, *non-retained*: erretenu gabeko frakzioa; eta R, *retained*: erretenitutako frakzioa). Kontrol gisa *gpdA*::FlbB::GFP proteina erauzkina erabili zen, RFP epitoporik zuen proteinarik ez izanik, erretxinera ez zukeen ezerk lotu beharko. Hain zuzen, R frakzioan ez zen proteinarik detektatzen, garbiketa urratsak ondo eman zirenean seinale. *Western-blot* berean ageri diren laginak KapA::mRFP eta FlbB::GFP forma basatiaren arteko entsegutik bereizi ziren laginei dagozkie. Kasu honetan R-n banda bat detektatu zen FlbB-ren tamaina parean (lauki berdeaz adierazia). Aldameneko proba KapA::mRFP eta FlbB(NLS\*)::GFP formen arteko entseguari dagokio, eta hemen ere FlbB(NLS\*)-ri zegokion banda nagusia bereiztu zen (lauki berdean ikus daiteke FlbB(NLS\*)-ren banda nagusia, beherago aurkitzen direnak degradazioz ageri diren fragmentuak izaki; Herrero-Garcia *et al.*, 2015). Banda hau gainera aldaera basatiarena baina indartsuagoa da, K67A eta R68A mutazio aldaketek KapA::mRFP eta FlbB::GFP-ren arteko ustezko interakzioa sendotu dezaketela iradokiz. Lagin guztiez mRFP-ren immunodetekzioa eta *coomassie*-az tindaketa bigarren gel batean burutu ziren, erretxinera KapA::mRFP behar bezala lotzen zela bermatzeko eta garbiketa urratsak zuzen bete zirela ziurtatzeko. Eskuinaldeko pull-down esperimentuak GFP-Trap<sup>®</sup> erretxinez burutu ziren. Kasu honetan, FlbB::GFP berari tiraka ea KapA::mRFP erortzen zen ikusi nahi zen. KapA detektatzeko mRFP antigorputzak erabili ziren. Bai FlbB bai FlbB(NLS\*) erretxinera lotzean bi R-tan KapA::mRFP-ri zegokion tamainan seinalea antzeman zen (lauki gorriez adieraziak). Kasu horretan ere, KapA::mRFP eta FlbB(NLS\*)::GFP-ren arteko entseguan banda sendoagoa antzeman zen. Aurreko probetan egin bezala, lagin berdinekin aztertutako bigarren gel bat *coomassie*-az tindatu zen kontrol modura. Bestalde, GFP antigorputzez, FlbB::GFP (edo aldaera mutantea) erretxinean aberastu zela ziurtatu zen.

## 4.2. ERANSKINA



**F1bD-ren cMyb eremuaren azterketa.** A) *Aspergillus nidulans*-en F1bD-ren cMyb eremua oinarri hartuta MYB eremuaren alineamendua (baliatutako espezie desberdinetan: *Aspergillus nidulans*, *Arabidopsis thaliana*; *Vitis Vinifera*; *Mus musculus* eta *Homo sapiens*). Myb eremuak 51-53 aminoazidotako R errepikapenez osatzen dira, eta R bakoitzak helize-bira-helize itxura hartzen du. Errepikapen bakoitzak hiru triptofano (edo aminoazido hidrofobo; izartxo adierazi dira) eduki ohi ditu aminoazido gehiagoz elkar bananduta eta erdigune hidrofobikoa osatuz helize-bira-helize egitura horren baitan, honek DNA-rekiko lotura egonkortzen du (Arratia eta Aguirre, 2013). *Aspergillus nidulans*-en F1bD-ren kasuan bi R-k osatzen dute cMyb eremua. Hiruki moreez tesi honetan isolatutako *flbD*<sup>-</sup> mutantearen E14G eta R87Q aminoazido mutatuak adierazten dira. Bestalde, hiruki horiaz (Wieser eta Adams, 1995) artikuluan identifikatu zen F1bD<sup>(E67K)</sup> mutante akonidialaren aminoazido mutatua adierazten da. Eta azkenik, turkesa koloreko hirukien bidez gatz-zubi hipotetikoak osatu ditzaketen aminoazidoak zehazten dira (E14-R41; D15-R49 eta E67-R92), (Ogata *et al.*, 1994) lanean oinarrituz. Horien artean kokatuko lirateke E14 eta E67 aminoazidoak ere. B) Usteko gatz-zubiak irudikatzen dira F1bD-ren cMyb eremuaren hiru dimentsiotako egituraren baitan. Irudia SWISS MODEL programa bioinformatikoak (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) sortutako eredu oinarri hartuta osatu da.

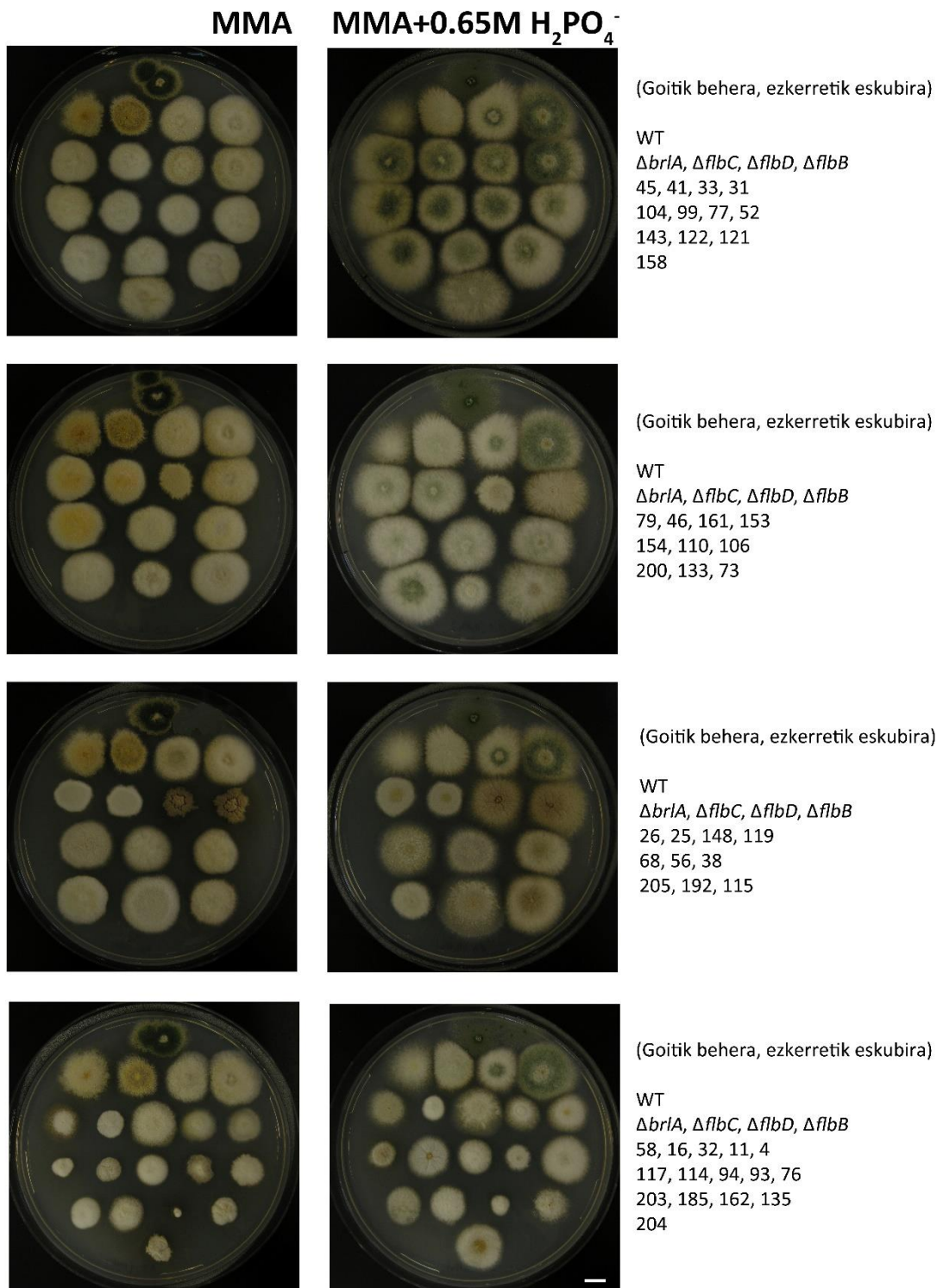
## 5.1. ERANSKINA

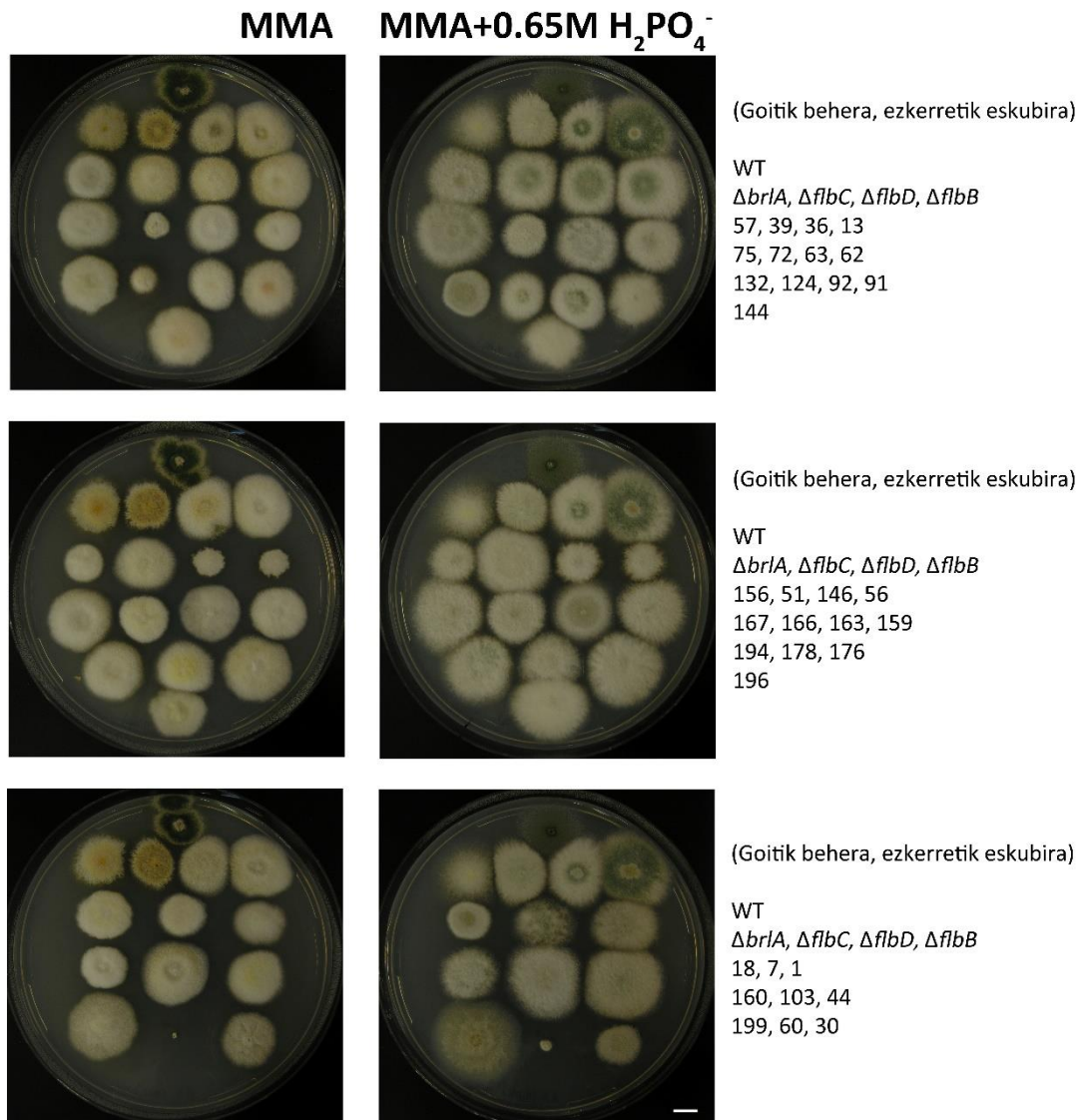


|                                   |     |     |     |      |      |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| <b>Mutagenesi denbora (254nm)</b> | 0s  | 60s | 80s | 100s | 120s |
| <b>Kolonia kopurua</b>            | 395 | 180 | 116 | 78   | 38   |

**Mutagenesirako baldintzen optimizazioa.** A)  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  kontzentrazio desberdinetan  $\Delta\text{flbB}$  anduiaren fenotipoa. 0.5M-tan onddoa iada konidiatzeko gai zen, baina kontzentrazioa 0.75M-ra igotzean konidiazioa are nabarmenagoa zen. Kontzentrazio altuagoetan, ordea, onddoaren hazkuntza kaltetuta aurkitzen zen. 0.75M-eko fosfato kontzentrazioan ere iada hazkuntza erradialaren inhibizio arin bat ikusi zela kontuan izanda, 0.65M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  erabiltzea erabaki zen. B) Kultura plakak, konidioen mutagenesia burutu eta 72 ordutara (37°C), UV uhin-luzera desberdinen (goiko ilara 365nm eta 254nm behekoa) eta esposizio denbora desberdinen (0-120 segundo bitartean) eragina aztertzeko. Taulan, 254nm-tan eta denbora desberdinetan plaka bakoitzean zenbatutako kolonia kopurua erakusten da. Energia baxueneko uhin-luzeraz ez zen kolonien populazioan aldaketarik antzeman; aldiz, 254nm-ko uhin-luzeraz esposizioa luzatu ahala biziraupen-tasa txikitzen zihoan. Ondorioz 254nm-ko uhin-luzera erabiltzea erabaki zen. Esposizio denborari dagokionez, hasiera batean inokulatutako 1 250 konidietatik %5-10 biziraupen-tasa ahalbidetuko zuen esposizio denbora finkatu nahi izan zen; horretarako esposizio denborak 80-100 segundu tartean behar zuela finkatu zen. C) Mutagenesi prozeduraren ostean (254 nm eta 80-100 segundu) begizatutako plaka baten adibidea. Gezi moreaz FLIP fenotipodun kolonia bat adierazten da. Eskala barra panel guztietan = 1 cm. Ikus ere 2.1. irudia materialak eta metodoak kapituluan.

5.2. ERANSKINA





Taldeen deskribapen orokorra:

|   |   |
|---|---|
| 1 | Erdialde inguruan konidiazio apur bat (erreferentzia <i>ΔflbD</i> anduiaren antza). Mutazioa <i>flbD</i> genean eman den susmagarriak   |
| 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfatotan. Estres baldintza inguru honetan ez da inongo konidiaziorik antzematen. Talde honen barruan bi azpitalde bereizi ditzakegu: hazte arazorik aurkezten ez dutenak eta jatorrizko <i>ΔflbB</i> erreferentzia anduiaren tamaina bera dutenak, eta bestetik hazte atzerapena edo kaltetuta dutenak. |
| 3 | Erdialde "bustia". Autolisi kasuak izan litezkeenak   |
| 4 | Hazteko arazoak aurkezten dituzten mutante akonidialak, <i>flbB</i> parentalarekin konparatuz kolonia tamaina txikiagoa izateagatik ezaugarritzen dira  |
| 5 | Fosfatotan egonkortzen direnak. Estres ingurune honetan egokitze, portaera, hobe erakusten dute ohiko MMA medioan baino.  |
| 6 | Apur bat konidiatzen dute, baina lehen taldearen aldean beren fenotipoak ez du <i>ΔflbD</i> -ren antzik   |
| 7 | Bestelakoak. Fenotipo anitzak, beste taldeetan sailkatu ezin izan direnak   |

| FLIPAO | Taldea | Fenotipo deskribapena   |
|--------|--------|---|
| 1      | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 4      | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak  |
| 7      | 6      | Apur bat konidiatzen dute, (ez du $\Delta flbD$ -ren antzik). Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                      |
| 11     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak  |
| 13     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (jatorrizko $\Delta flbB$ andui parentalaren antza)  |
| 16     | 4      | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. Hifa bereziki motzak eta gutxi zabaltzen direnak   |
| 18     | 3      | Erdialde "bustia"   |
| 25     | 3      | Erdialdetik "bustia" (erdialde ilunagoa). Tamaina ertaina (=26)   |
| 26     | 3      | Erdialdetik "bustia" (erdialde ilunagoa). Tamaina ertaina (=25)   |
| 30     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du, hifa motzak eta gutxiago zabaltzen direnak  |
| 31     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 32     | 5      | <i>Fluffy</i> fenotipo. Kolonia "lausoa" hifa ondo definitu gabe eta zabalduak  |
| 33     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 36     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 38     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 39     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 41     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 44     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 45     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 46     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 51     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 52     | 1      | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 56     | 3      | Erdialde "bustia"   |
| 57     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 58     | 4      | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. Kolonia "lausoa" eta ondo definitu gabeko hifa sakabanatuak                              |
| 60     | 4      | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. Hifa bereziki motzak eta gutxi zabaltzen direnak   |
| 62     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak                                      |
| 63     | 2      | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak, baina itxura "zakarra" erakusten du |
| 68     | 7      | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Koloniak ehundura "zakarra" du   |

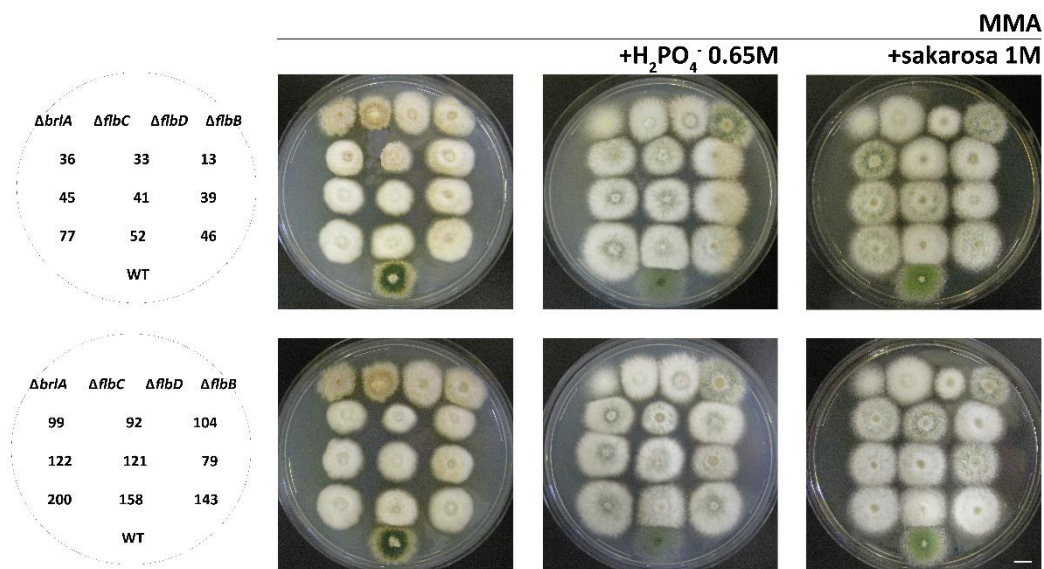
|     |   |  |
|-----|---|--|
| 72  | 5 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Fosfatotan egonkortu egiten dela dirudi, MMA-n baina hazte handiagoa erakusten duelarik. Fosfato baldintzapean hifa luzeak eta ondo zabaltzen direnak |
| 73  | 7 | Fenotipo akonidiala. Kolonia "lausoa"  |
| 75  | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 76  | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du, hifa laburragoak eta gutxiago zabaltzen direnak  |
| 77  | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 79  | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 86  | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina ertaina eta adarkatua. MMA-an hazte mugatua du, hifa laburrak eta hedatze mugatukoak (=146)                              |
| 91  | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 92  | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 93  | 4 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. Fosfato ingurunean badirudi egonkortu egiten dela, non hifak "difusoak" diren                   |
| 94  | 4 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. MMA-n hifa motzak eta gutxi zabaltzen direnak, fosfatotan aldiz zabaltze handiagoa dute         |
| 99  | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 103 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 104 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 106 | 6 | Apur bat konidiatzen dute, (ez du $\Delta flbD$ -ren antzik). Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak (=110)                      |
| 110 | 6 | Apur bat konidiatzen dute, (ez du $\Delta flbD$ -ren antzik). Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak (=106)                      |
| 114 | 5 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Fosfatotan egonkortu egiten dela dirudi. MMA-n fenotipo zimurtsua aurkezten du. Fosfato baldintzapean hifa luzeagoak eta hobeto zabaltzen direnak     |
| 115 | 7 | Fenotipo akonidiala, kolore marroi leunekoa. Autolisi erdialde hezea izan dezakeela pentsa daiteke.  |
| 117 | 4 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da. Hifa motzak eta gutxi zabaltzen direnak   |
| 119 | 5 | Fosfatotan egonkortu egiten da, kolore marroizta. Ohiko MMA medioan izar itxurako fenotipoa, kolore marroi biziaz.(=149)   |
| 121 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 122 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 124 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 132 | 3 | Erdialde "bustia". Tamaina ertaina   |
| 133 | 7 | Apur bat konidiatzen dute. Tamaina mugatua   |
| 135 | 7 | Fenotipo akonidiala eta tamaina mugatua. Kolonia "textura zakarra" eta hifa ondo definitu gabeak   |
| 143 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziazko $\Delta flbD$ anduiaren antza)  |
| 144 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 146 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina ertaina eta adarkatua. MMA-an hazte mugatua du, hifa laburrak eta hedatze mugatukoak (=86)                               |

|     |   |  |
|-----|---|--|
| 149 | 5 | Fosfatotan egonkortu egiten da, kolore marroizta. Ohiko MMA medioan izar itxurako fenotipoa, kolore marroi biziaz.(=119)   |
| 153 | 7 | Kolore marroi argiko fenotipo akonidiala. izar itxurako kolonia hifa adarkatuez. "eguzki-lorea itxura"   |
| 154 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 156 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du, hifa laburragoak eta gutxiago zabaltzen direnak  |
| 158 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziatzko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 159 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 160 | 7 |  |
| 161 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina ertaina eta forma adarkatua du   |
| 162 | 4 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, koloniaren diametroa nabarmenki txikia. Hifa motzak eta gutxi zabaltzen direnak   |
| 163 | 3 | Erdialde inguru "bustia", autolisi kasu adierazkorra   |
| 166 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 167 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 176 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 178 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 185 | 4 | <i>Fluffy</i> fenotipoa. Hazte arazoak ditu, kolonia diametroa murriztagoa da baina hifak nahiko sakabanatuta ageri dira   |
| 192 | 3 | Erdialde "bustia". Kolonia "lausoa"  |
| 194 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 196 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Jatorrizko kolonia tamaina mantentzen du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 199 | 3 | Autolisi kasu adierazkorra (bereziki denborak aurrera egin ahala, autolisia nabariagoa da). Fosfato gabeko medioan ez du arazorik aurkezten. Hazte arazorik gabeko kolonia tamaina |
| 200 | 1 | Erdialdean konidiazio apur bat (erreferentziatzko $\Delta flbD$ anduiaren antza)   |
| 203 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du eta sakabanatuta hedatzen diren hifa luzeak   |
| 204 | 5 | Fosfatotan egonkortu egiten da. Ohiko MMA-n fenotipo zimurtsua aurkezten du, hazi ezingo balu bezala. Fosfato baldintzapean hobeto hazten da                                       |
| 205 | 2 | <i>Fluffy</i> fenotipoa fosfato baldintzetan. Tamaina murriztua du, hifa laburragoak eta gutxiago zabaltzen direnak  |

Irudietan 81 FLIP hautagaien fenotipoa MMA eta MMA+0.65M fosfato medioetan. Goyaldean andui basatiaz batera, fosfatodun medioan akonidialak diren erreferentzia anduiak ( $\Delta brlA$ ,  $\Delta flbC$ ,  $\Delta flbD$  eta  $\Delta flbB$ ) aurkitzen dira. Eskala barra = 1 cm. Ondorengo taulan FLIP hautagaien sailkapena eta 0.65M fosfatodun MMA medioan duten fenotipoaren deskribapena egiten da.



## 5.3. ERANSKINA



Lehen taldeko FLIP mutanteen fenotipoa MMA-n, 0.65M fosfatodun eta 1M sakaroadun MMA medioetan, hurrenez hurren. Erreferentziako anduiak: plaken goiko ilaran (eskuinetik ezkerrera: *ΔflbB* (parentala), *ΔflbD*, *ΔflbC* eta *ΔbrlA*) andui akonidialak ageri dira eta behe-beheko aldean andui basatia (WT). Tartean aurkitzen dira lehen taldeko FLIP hautagaiak, fosfato medioan *ΔflbD* anduiaren antza zutenak alegia. Fosfatotan antza bazuten ere, 1M sakaroadun medioan fenotipo patroi desberdinak erakutsi zituzten. Eskala barra = 1 cm.

## 5.4. ERANSKINA

A

(T9)  
TPA\_asm: Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome IVGenBank: BN001304.1  
GenBank FASTA

B

(T21)  
TPA\_asm: Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome IVGenBank: BN001304.1  
GenBank FASTA

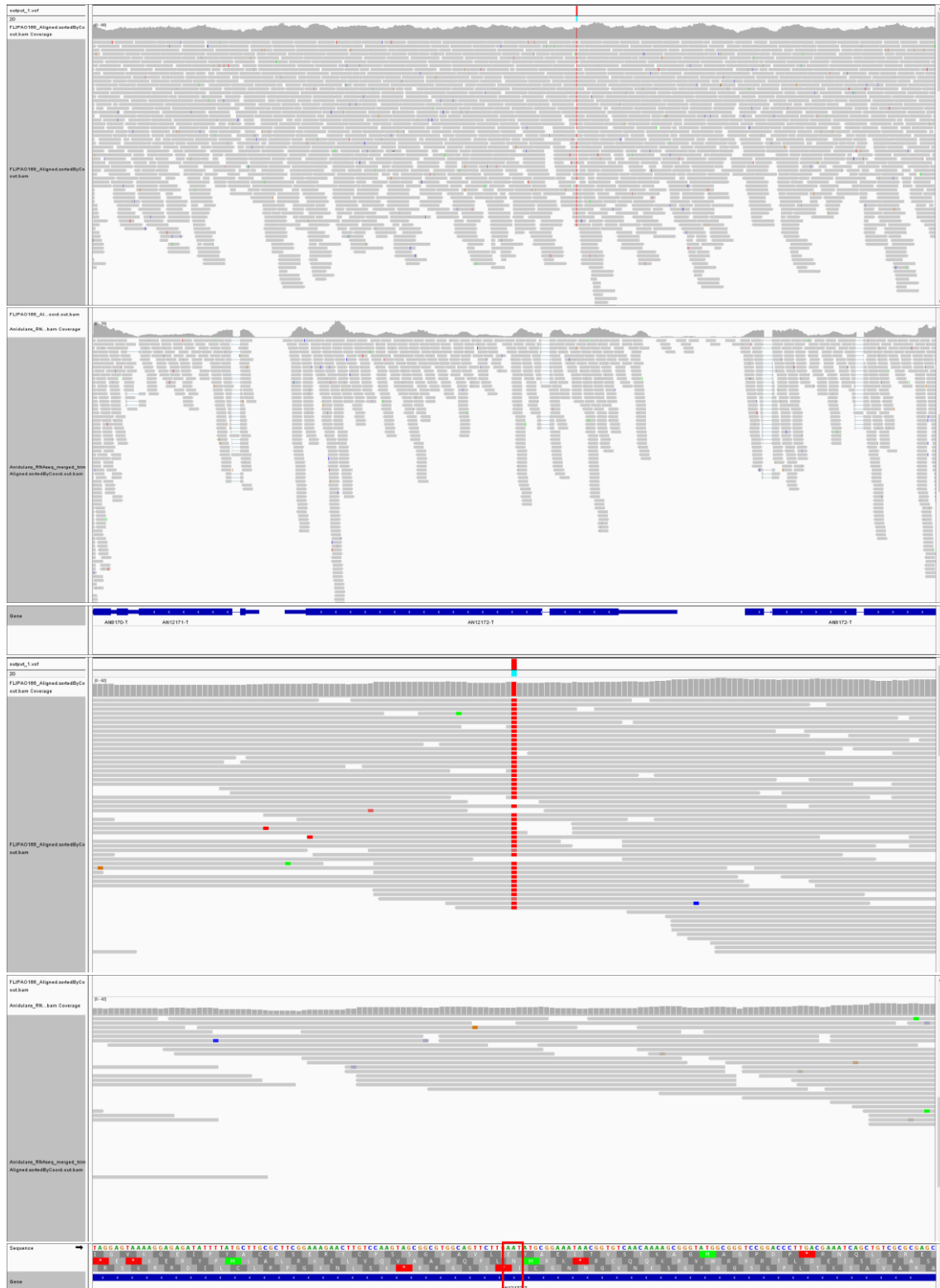
C

(T15)  
TPA\_asm: Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome VGenBank: BN001305.1  
GenBank FASTA

Genotekaz FLIP166-ren protoplastoak transformatu eta isolatutako T9, T15 eta T21 transformante konidianteen plasmidoak sekuentziatu ziren. pRG3Up eta pRG3Dw oligonukleotidoen insertoak sekuentziatu ahal izan zen eta fenotipoa berreskuratu zuen genomaren zatia identifikatu. Irudi bakoitzean bi oligonukleotidoen sekuentziatutako eremuak adierazten dira (behealdeko sekuentziak) eta eremu horiek mugatutako genomaren zatia adierazten da (berdez). A eta B irudietan, T9 eta T21 transformantei dagozkienak hurrenez hurren, *fbb* genea identifikatu zen. C irudiaren kasuan, T15 transformanteak *AN8501* eremua zeraman plasmidoa hartu zuen.

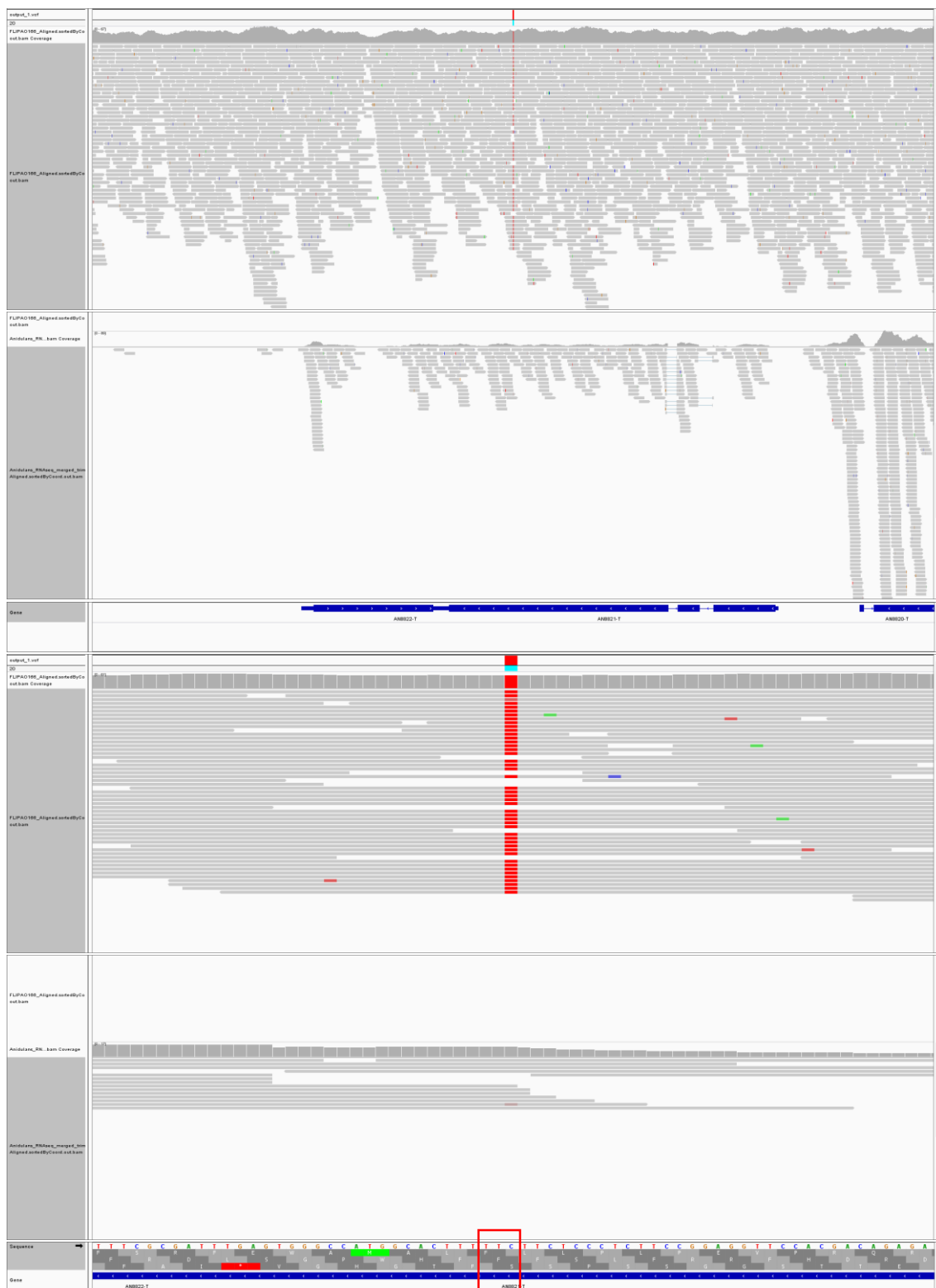
## 5.5. ERANSKINA:

## 1) An12172 (ChrII): LCCL eremua daraman mintz zeharreko proteina.



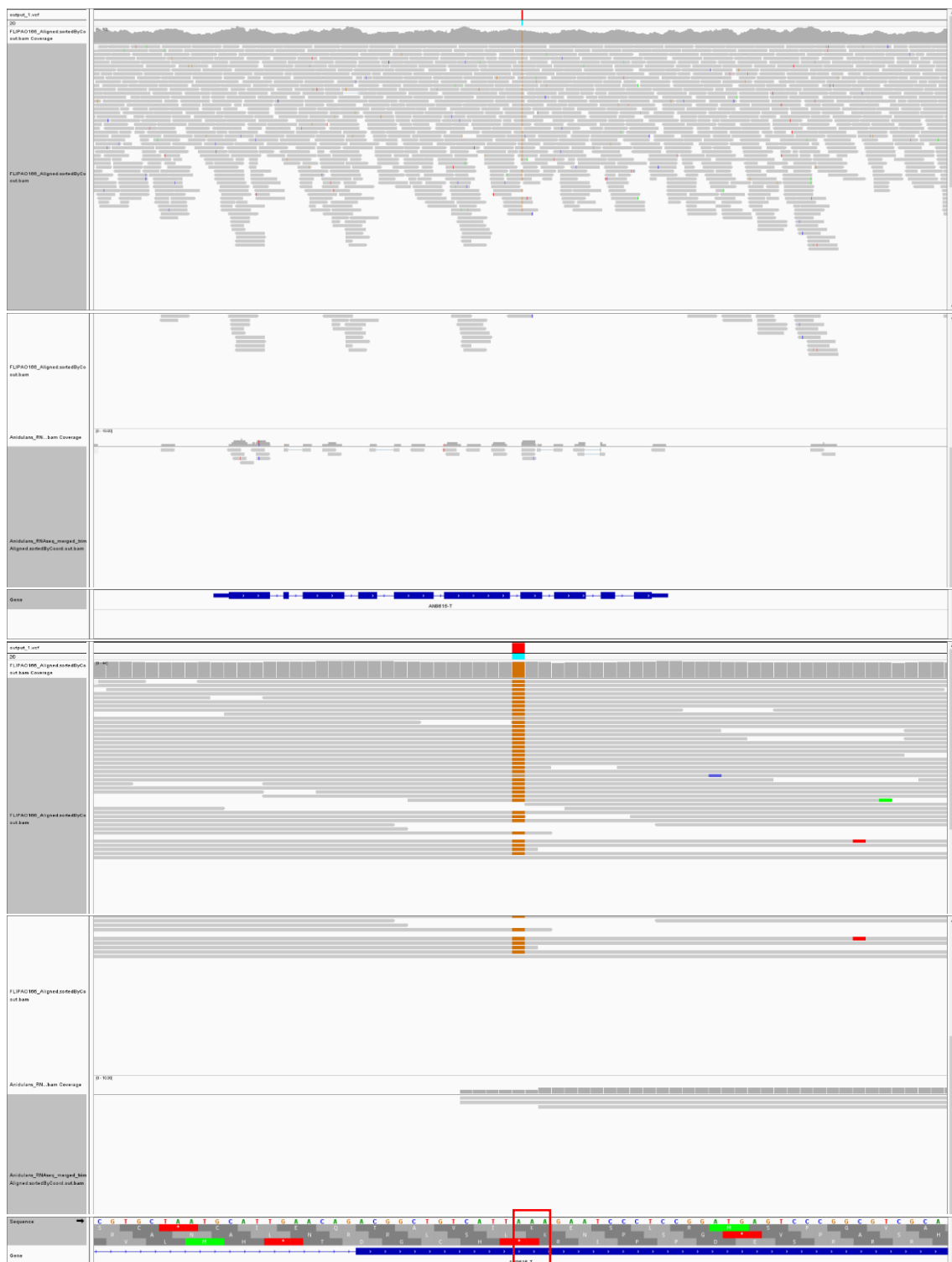
Adaketa puntuala 94. Kodoiean. ATT (Ile) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz AAT (Asn) FLIP166 mutantean. Sanger sekuentziazioaz egiaztatuta.

2) An8821 (ChrIII): Karakterizatu gabea.



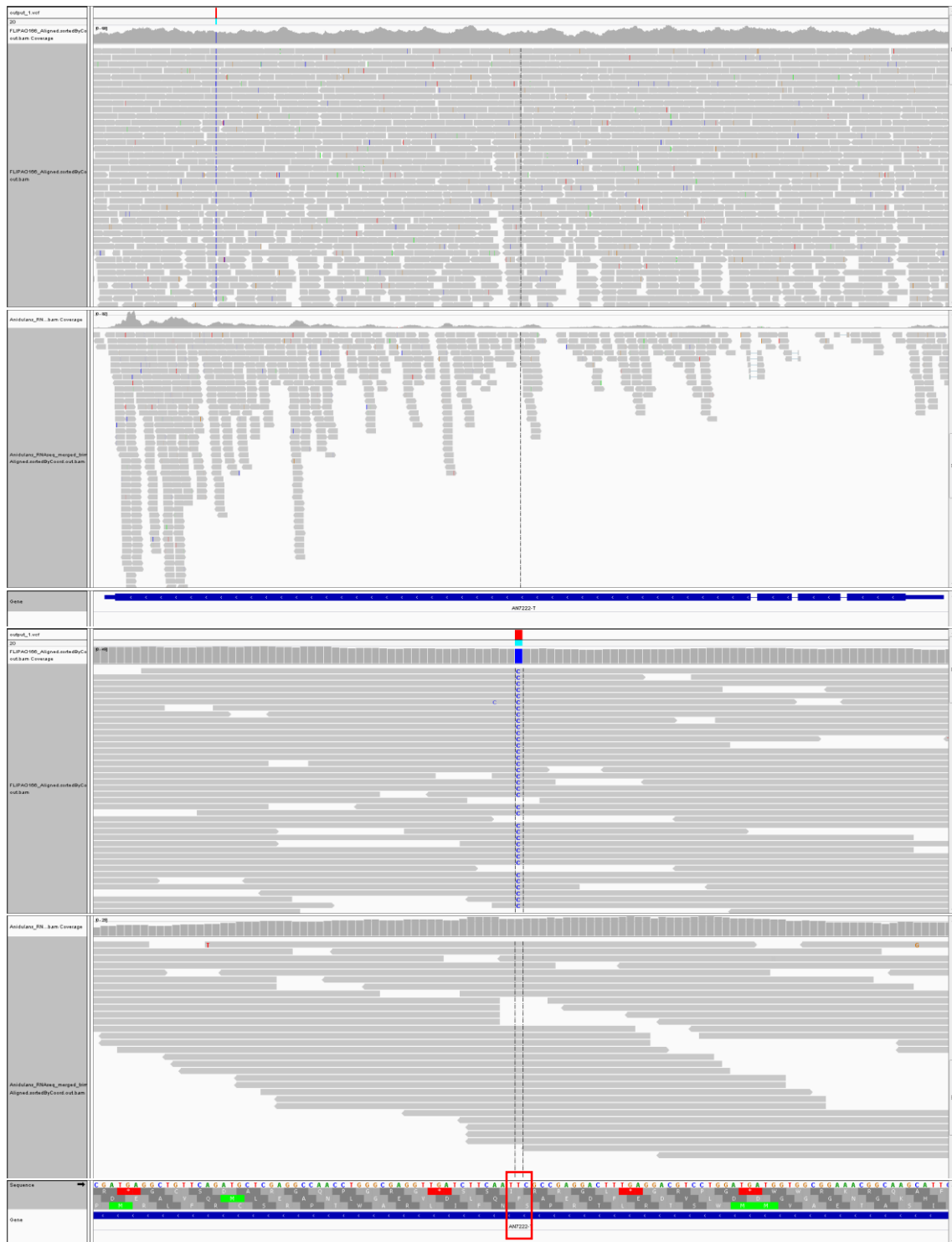
Aldaketa puntuala 515. kodoian. GAA (Glu) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz AAA (Lys) FLIP166 anduian. Mutazioa Sanger sekuentziazioaz egiaztatua.

## 3) An8615 (ChrIII): P450 zitokromoa (CYP677A1)



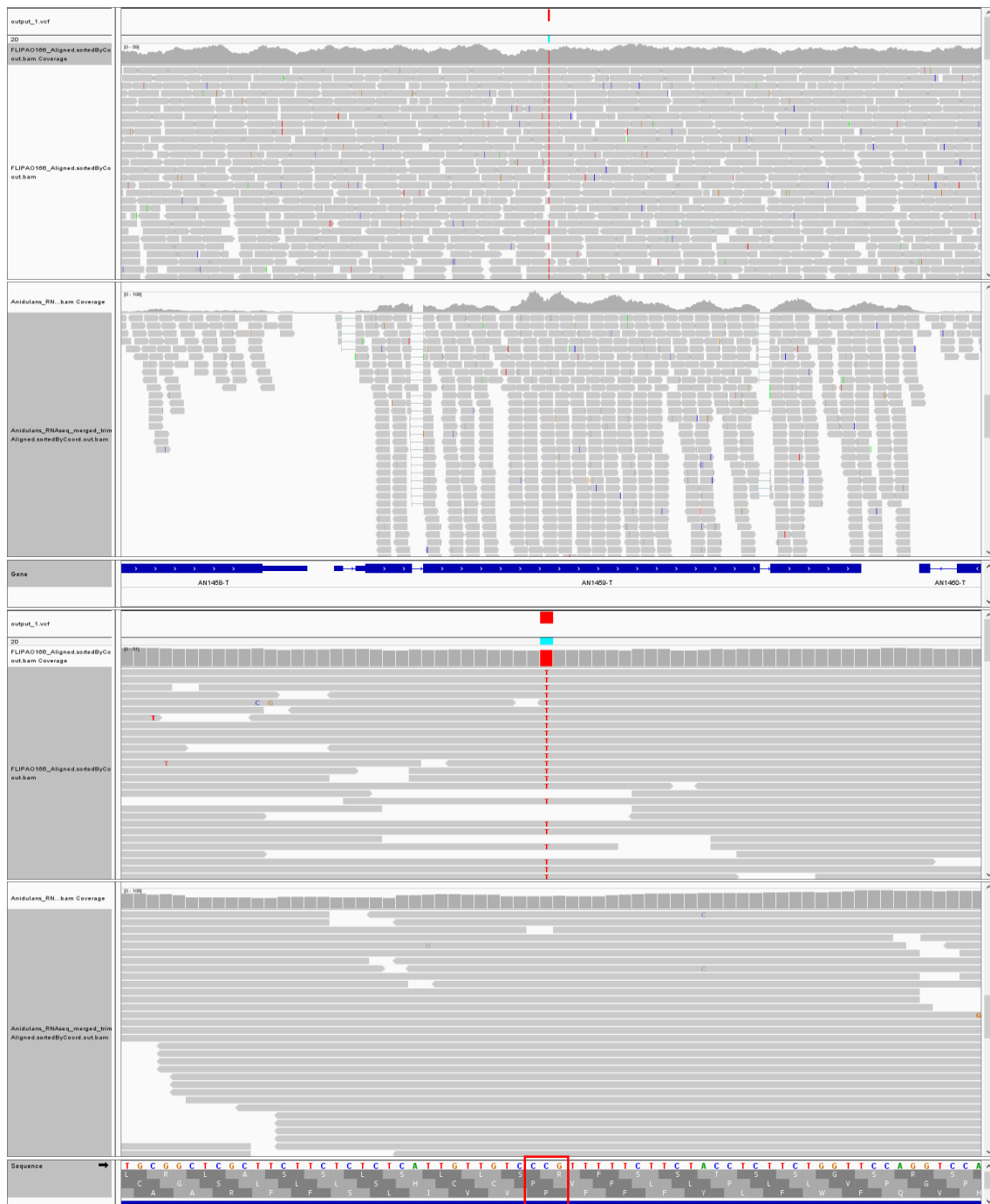
Aldaketa puntuala 363. kodoian. AAA (Lys) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz GAA (Glu) FLIP166 anduian. Mutazioa Sanger sekuentziazioaz egiaztatua.

4) An7222 (ChrIV): NACHT eremua daraman proteina



Aldaketa puntuala 1793. kodoiean. GAA (Glu) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz GGA (Gly) FLIP166 anduian. Mutazioa Sanger sekuentziazioaz egiaztatua.

5) An1459 (ChrVII): O-manosiltransferasa proteina (PmtC), hazkuntza eta konidiazioan esku-hartzen duena. Mintz zeharreko proteina.



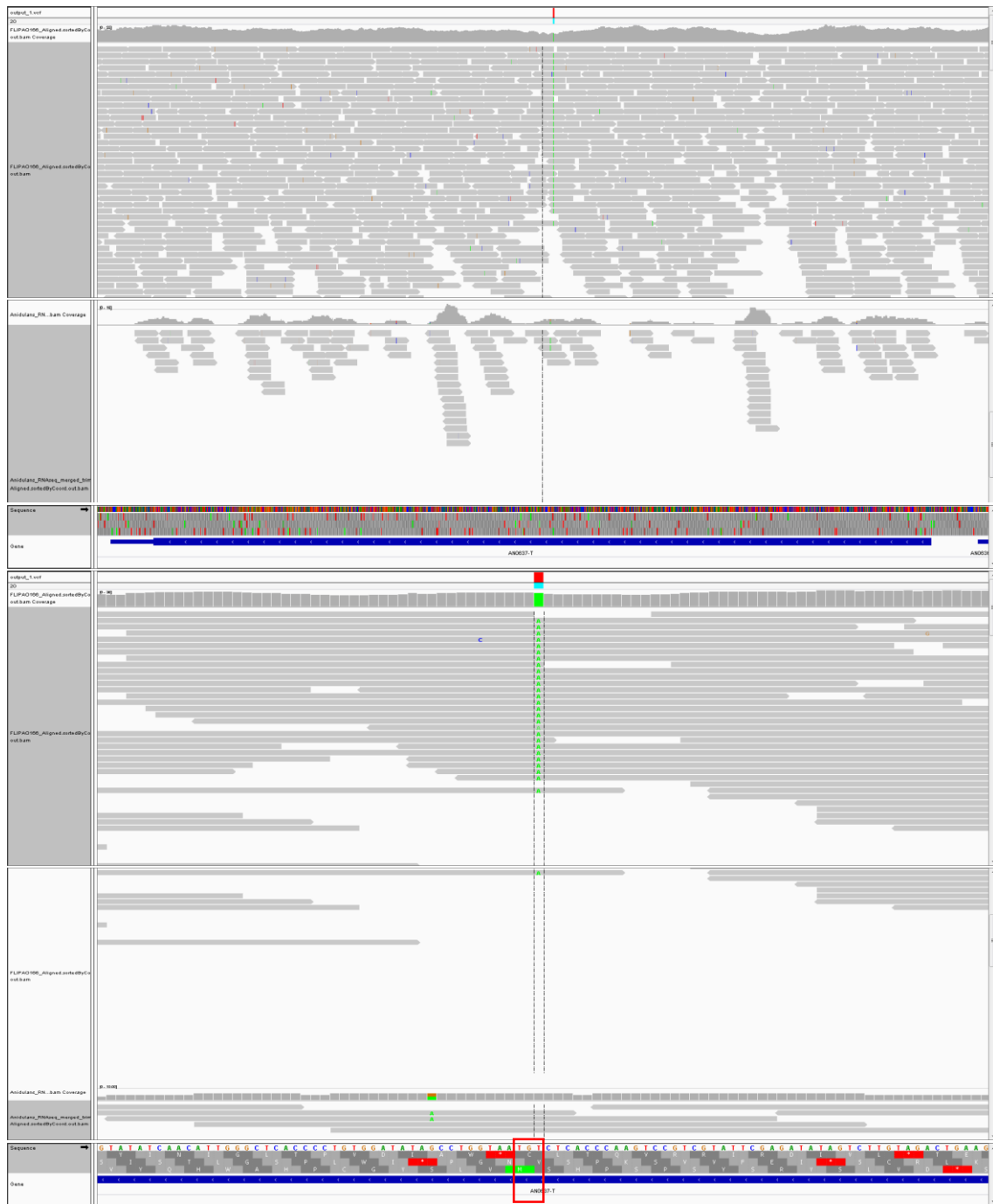
Aldaketa puntuala 282. kodoian. CCG (Pro) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz CTG (Leu) FLIP166 anduian. Mutazioa Sanger sekuentziazioaz egiaztatua.





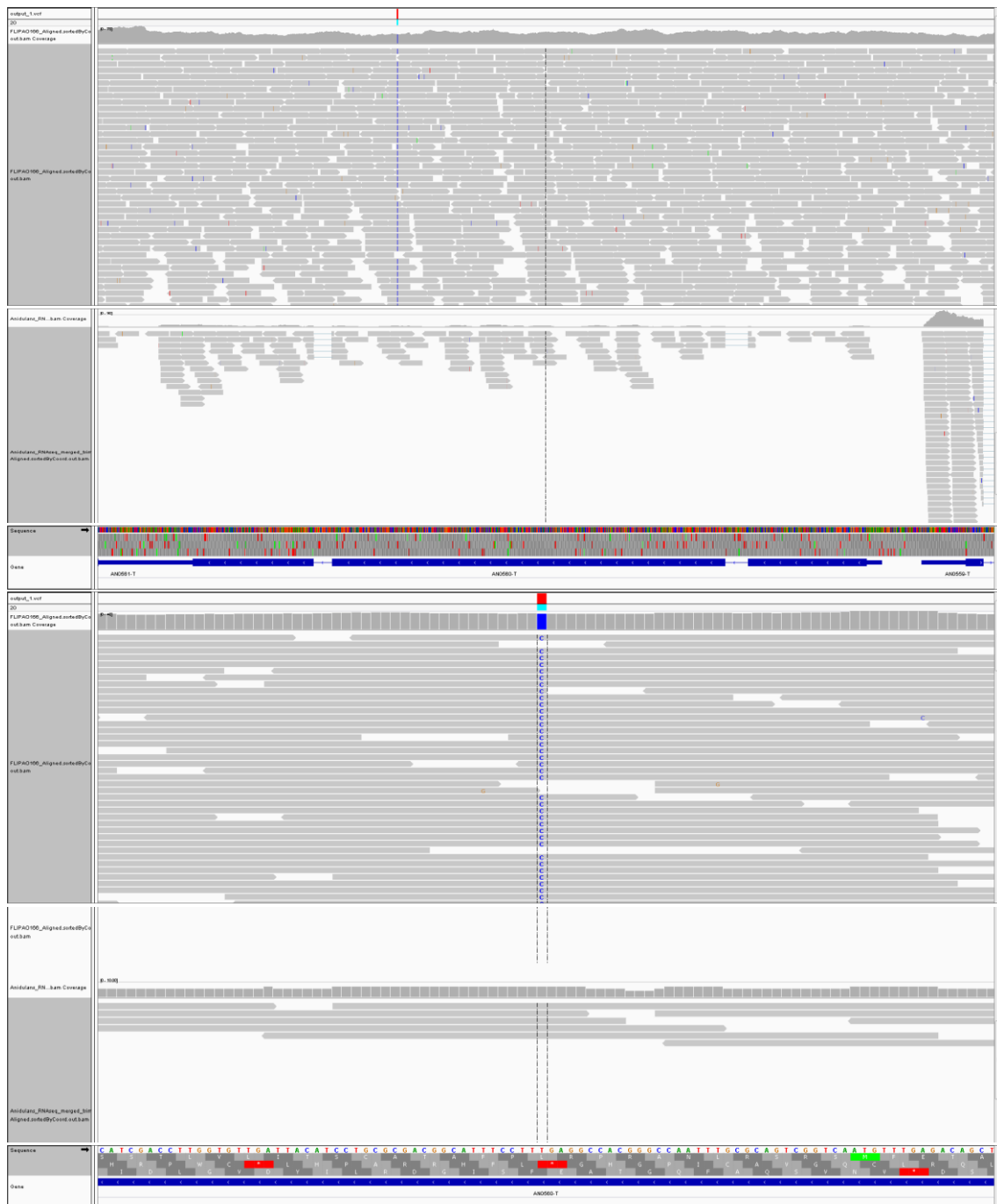


8) An0637 (ChrVIII): Helikasa.



Aldaketa puntuala 415. kodoian. ACA (Thr) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz TCA (Ser) FLIP166 anduian. Sanger sekuentziazioaz egiaztatu gabea.

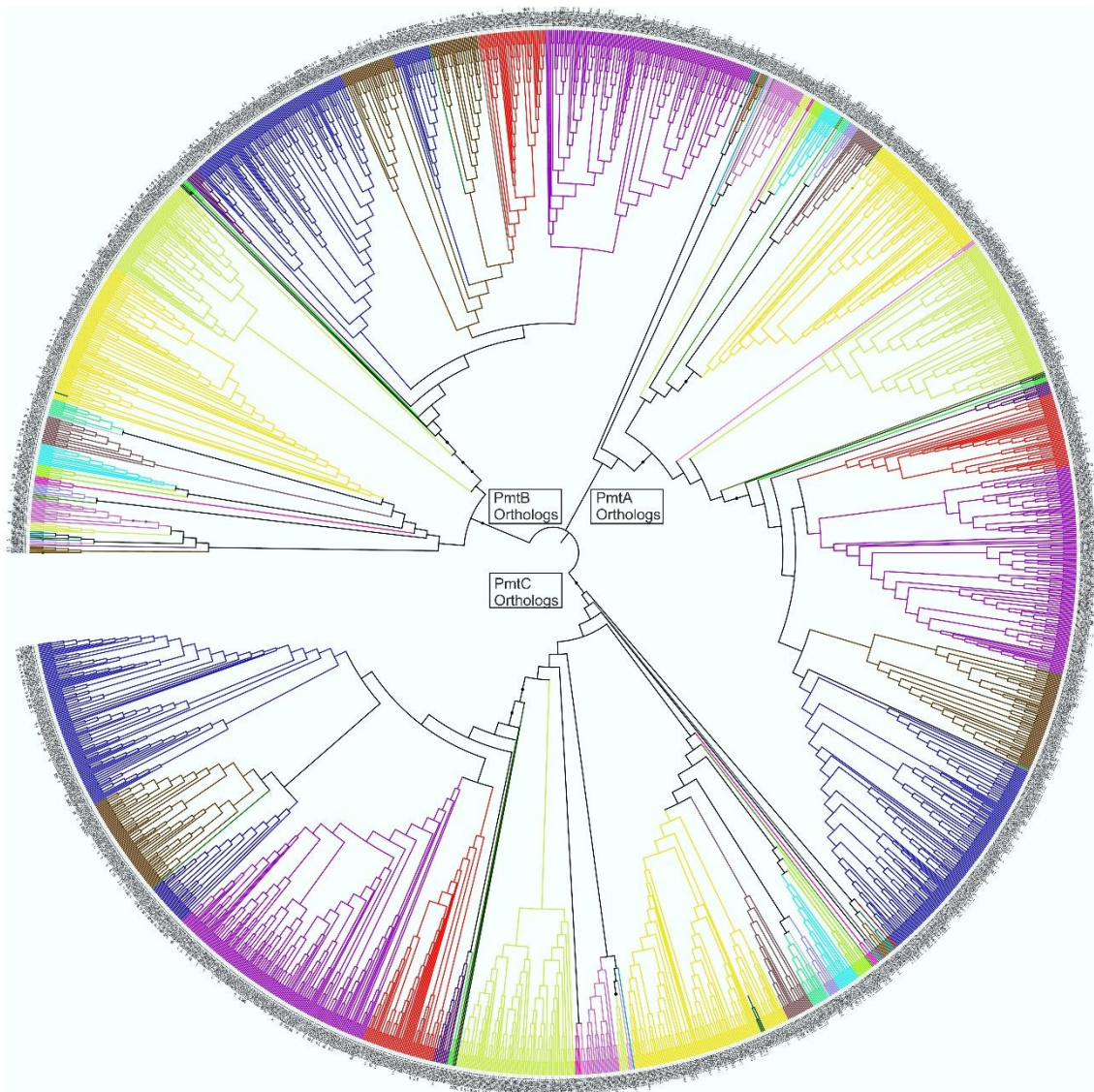
9) An0560 (ChrVIII): Ortologoek Golgi eta mintz plasmatico arteko garraioan eta exozitosi prozesuetan dihardute.



Aldaketa puntuala 488. kodoian. AAA (Lys) FGSCA4 erreferentzia anduian eta RNA-seq irakurketetan, aldiz GAA (Glu) FLIP166 anduian. Mutazioa Sanger sekuentziazioaz egiaztatua.

FLIP166 mutantearen DNA genomikoa sekuentziaztean aurkitutako mutazio hautagaiak. Irudian, IGV software-arekin egindako sekuentziazio irakurketen azterketa erakusten da, beti ere erreferentziazko sekuentzia desberdinak erabilia kontrol moduan (Ikus testu nagusia). Soilik FLIP166-n aurkitzen ziren eta exonikoak ziren mutazioak hartu ziren aintzat.

## 5.6. ERANSKINA



|                   |                         |                      |                          |                      |
|-------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| ■ Eurotiomycetes  | ■ Neoelectomycetes      | ■ Mortierellomycetes | ■ Dacrymycetes           | ■ Zoopagomycetes     |
| ■ Dothideomycetes | ■ Taphrinomycetes       | ■ Basidiobolomycetes | ■ Monoblepharidomycetes  | ■ Kickxellomycetes   |
| ■ Sordariomycetes | ■ Saccharomycetes       | ■ Pucciniomycetes    | ■ Wallemiomycetes        | ■ Dimargaritomycetes |
| ■ Leotiomycetes   | ■ Pneumocystidomycetes  | ■ Microbotryomycetes | ■ Chytridiomycetes       | ■ Malasseziomycetes  |
| ■ Xylonomycetes   | ■ Schizosaccharomycetes | ■ Mixiomycetes       | ■ Neocallimastigomycetes | ■ Exobasidiomycetes  |
| ■ Lecanoromycetes | ■ Mucoromycetes         | ■ Tremellomycetes    | ■ Blastocladiomycetes    | ■ Ustilaginomycetes  |
| ■ Pezizomycetes   | ■ Glomeromycetes        | ■ Agaricomycetes     | ■ Entomophthoromycetes   | ■ Harpellomycetes    |
| ■ Orbiliomycetes  |                         |                      |                          |                      |

PmtA/AN5105, PmtB/AN4761 eta PmtC/AN1459 proteinen O-manosiltransferasen 2169 ortologo fungikoez osatutako zuhaitz filogenikoa. Zuhaitza MegaX programaz eraiki eta iTOL programaz editatu zen. Kolore bakoitzak onddoen erreinuko klase bat adierazten du eta dagozkion ortologoak ere kolore horretan aurkezten dira. Hiru proteinen O-manosiltransferak klase fungiko nagusien artean konserbatuta daude.

## **8. KAPITULUA: Artikuluak**





# Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB

Ainara Otamendi<sup>1</sup> · Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi<sup>1</sup> · Elixabet Oiartzabal-Arano<sup>1</sup> · Marc S. Cortese<sup>1</sup> · Eduardo A. Espeso<sup>2</sup> · Oier Etxebeste<sup>1</sup>

Received: 24 December 2018 / Revised: 17 April 2019 / Accepted: 29 April 2019 / Published online: 7 May 2019  
© Springer Nature Switzerland AG 2019

## Abstract

Permanently polarized cells have developed transduction mechanisms linking polarity sites with gene regulation in the nucleus. In neurons, one mechanism is based on long-distance retrograde migration of transcription factors (TFs). *Aspergillus nidulans* FlbB is the only known fungal TF shown to migrate retrogradely to nuclei from the polarized region of fungal cells known as hyphae. There, FlbB controls developmental transitions by triggering the production of asexual multicellular structures. FlbB dynamics in hyphae is orchestrated by regulators FlbE and FlbD. At least three FlbE domains are involved in the acropetal transport of FlbB, with a final MyoE/actin filament-dependent step from the subapex to the apex. Experiments employing a T2A viral peptide-containing chimera (FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP) suggest that apical FlbB/FlbE interaction is inhibited to initiate a dynein-dependent FlbB transport to nuclei. FlbD controls the nuclear accumulation of FlbB through a cMyb domain and a C-terminal LxxLL motif. Overall, results elucidate a highly dynamic pattern of FlbB interactions, which enable timely developmental induction. Furthermore, this system establishes a reference for TF-based long-distance signaling in permanently polarized cells.

**Keywords** Filamentous fungi · Hyphal growth · Development · Signal transduction · Polarity site-to-nucleus communication

## Introduction

The ability to adapt to changes in environmental conditions is a key feature of living organisms. With this aim, eukaryotic cells monitor the environment, receive signals from it, interiorize, amplify and integrate these cues, and finally convey the corresponding information to nuclei in the form of proteins (transcription factors; TFs) that are able to modify

gene expression patterns and, consequently, induce the adaptive cellular response. All these steps are carried out following a variety of molecular mechanisms that are generally classified as signal transduction pathways [1].

Permanent polarization of specific cell types such as neurons, pollen tubes or hyphae (see next paragraph) significantly increases the distance between polarity sites (i.e., growth cones in neurons or tips of hyphae) and nuclei, complicating the transduction of signals along this path [2–5]. Thus, permanently polarized cells have necessarily developed transduction mechanisms that are capable of covering the corresponding distances with speed and reliability. In neurons, these mechanisms are based mainly on calcium waves, but also on the retrograde transport of macromolecular complexes [5–7]. Retrograde transport of macromolecular complexes is used to control key neuronal processes such as the response to injury [8]. The main messengers in those complexes can be kinases which ultimately transfer the signal to a TF in the nuclear periphery or inside the nucleus, or TFs themselves that are able to migrate basipetally from

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03121-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Oier Etxebeste  
oier.echeveste@ehu.es

<sup>1</sup> Biochemistry II Laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, Manuel de Lardizabal, 3, 20018 San Sebastian, Spain

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

the polarity site to the nucleus and directly modify gene expression.

Hyphae are the characteristic cell type of filamentous fungi. These permanently polarized structures elongate by pulsed extension of the tip apex [9] that is dependent on receiving plasma membrane and cell-wall materials that are transported first on microtubules (MT) and then on actin filaments [10, 11]. The fast polar growth of fungal hyphae increases turgor pressure impinged on the substrate, facilitating its efficient colonization. Hyphae also sense the environment and vary their growth direction in response to different stimuli such as chemical, topographical or electrical signals [12–17]. Under unfavorable growth conditions [18–20] and/or in response to specific chemical signals [21], developmental transitions are triggered in hyphae, producing sexual or asexual spores depending on the stimulus [22]. Asexual spores are mitotic spores constituting the prevalent mechanism for dissemination of fungi. Recent findings have shown the existence of signaling complexes retrogradely transiting from the tip of hyphae to nuclei [3, 5, 23–26]. Although a limited number of them have been characterized, these mechanisms are based, as in neurons, either on kinase modules or the direct basipetal transport of TFs. These factors control stress responses as well as the sexual and asexual multicellular developmental cycles of filamentous fungal species such as *Aspergillus nidulans*.

This ascomycete is the preferential reference organism used in the study of the genetic and molecular control of fungal asexual development [27]. Most of the developmental transitions leading this fungus to the production of asexual spores, known as conidia, are controlled by the central developmental pathway (CDP) [20]. *brlA* is the first CDP gene and, thus, many signal transduction pathways activating or inhibiting conidiation converge at its promoter region so as to coordinately control its expression [28]. The upstream developmental activation (UDA) pathway is one of the main signal transduction pathways controlling *brlA* expression [29]. Three UDA TFs, FlbB, FlbC, and FlbD, bind the *brlA* promoter [30, 31] and control conidiation jointly with TFs from other pathways [28]. FlbC has been located in a sub-pathway parallel to that defined by FlbB and FlbD [31]. The regulatory activity of FlbB and FlbD is interdependent, since the former controls the expression of *flbD* but it cannot bind the promoter of *brlA* in the absence of FlbD [30].

The regulatory activity of FlbB strongly depends on its subcellular dynamics. FlbB is the first known fungal TF showing an apical localization [32]. Indeed, previous work showed that the FlbE-dependent tip localization of FlbB is a pre-requisite for timely control of *brlA* expression and that this TF is transported basipetally from the growth region to nuclei (hyphae of *A. nidulans* are multinucleate) [23]. In this work, we have delimited in space and time the role of UDA proteins FlbE and FlbD in regards to the control of

FlbB dynamics. Through at least three domains, FlbE plays an essential role in the acropetal dynamics of FlbB towards the growing apex of the tip. Nevertheless, results suggest that FlbB/FlbE interaction is inhibited by an as-yet-unknown mechanism, initiating a tip-to-nucleus dynein- (and thus MT-) dependent basipetal migration of FlbB. FlbD positively controls the nuclear accumulation of FlbB through at least a highly conserved N-terminal cMyb transcriptional regulatory domain and a C-terminal LxxLL motif. Taking everything into consideration, results suggest that a precise sequence of interactions determines the directionality of FlbB dynamics, facilitating communication between the hyphal tip and nuclei, and consequently leading to timely coordination of the TFs that control the expression of *brlA*.

## Materials and methods

### Oligonucleotides, strains, and culture conditions

Supplementary Tables S1 and S2 show, respectively, the oligonucleotides and the strains of *A. nidulans* used in this work. Strains were cultivated in supplemented liquid or solid *Aspergillus* minimal (AMM) or complete (ACM) media [33, 34], using glucose (2%) and ammonium tartrate (5 mM) as carbon and nitrogen sources, respectively. Fermentation medium (AFM), which contained 25 g/L corn steep liquor (Sigma-Aldrich) and sucrose (0.09 M) as the carbon source, was used to culture samples for protein extraction [35]. Mycelia for DNA extraction and Southern-blot analysis were cultured in liquid AMM and the procedures described previously by us were followed [36].

Conidia production on solid medium was calculated as described previously by us [30], using 3–6 replicates for each strain. Briefly, asexual spores produced by 48 or 72 h-old colonies were collected in a solution containing 0.02% Tween 20. Their concentrations were determined using a Thoma cell counter and dividing the total amount of conidia by the area of the corresponding colony. Average conidia production of each mutant strain ( $\pm$  SD) was compared to that of the reference strain(s). The two-tailed Student's *t* test for unpaired samples was used to determine the statistical significance of the changes in conidia production in each comparison. GraphPad Prism (version 8.0.1) was used to carry out statistical analyses and to draw column bar graphs.

Gene overexpression through the use of *alcA<sup>P</sup>* was induced in solid medium that contained threonine (100 mM) and repressed when glucose (2%) was used. For the *alcA<sup>P</sup>*-mediated overexpression in liquid culture, first  $10^6$  conidia per milliliter were cultured at 37 °C for 18 h in standard AMM. Then, mycelia samples were filtered and transferred to AMM that contained threonine (100 mM) as the carbon



source, with additional 20 h of culture [37]. Hyphal and conidiophore morphology were then analyzed using a Nikon Optiphot microscope, coupled to a Nikon FX-35DX camera.

Fluorescence microscopy analyses were conducted by inoculating conidiospores of *A. nidulans* strains in supplemented watch minimal medium (WMM) [38] and incubating them for 18 h at room temperature.

As a sample and a tutorial of the multiple advantages for genetic manipulation offered by *A. nidulans*, the procedures followed for the generation of strains expressing wild-type or mutant forms of the proteins of interest, expressed through native or constitutive promoters, and tagged at N- or C-termini, are briefly described along the results section as supplementary figures. Most of those procedures, as well as those followed for the generation of deletants, are based on the fusion-PCR technique developed by Yang and colleagues and the subsequent protoplast transformation protocol developed by Tilburn and colleagues or Szczyk and colleagues [39–41]. Cys-to-Ala mutants of FlbB were generated by transforming protoplasts with mutant *pgpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB<sup>(Cys-to-Ala)</sup>* plasmids. Recombination of these mutant plasmids was directed to the *pyroA* locus. The strain expressing GFP::FlbB in a *nudA1* genetic background was generated by meiotic crosses [42]. Protoplasts of this strain were transformed with an *hhoA::mrfp::pyrG* construct.

## Fluorescence microscopy

Subcellular localization of FlbB and FlbE in hyphae was analyzed as previously described using a Leica DMI-6000b or a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscopes [23, 43]. The former is equipped with a 63× Plan Apo 1.4 N.A. oil immersion lens from Leica, and filters GFP (excitation at 470 nm and emission at 525 nm) and Txred (excitation at 562 nm and emission at 624 nm). The latter includes a 63× Plan Apochromat 1.4 oil immersion lens, and filters 38 (excitation at 470 nm and emission at 525 nm) and 43 (excitation at 545 nm and emission at 605 nm). Fluorescence levels were measured using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij>) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Briefly, lines covering the region from the tip of hyphae to at least the most apical nucleus were drawn. Intensity plots were generated and the average intensity at each of the regions of interest was calculated as the mean of at least 4 points (0.4 μm) in the case of apices and 10–20 points in the case of nuclei (1–2 μm, depending on the width of the nuclear segment; G1 or G2 nuclei). The fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus was calculated for each hypha analyzed. The average ratio for a group of hyphae corresponding to each genetic background was calculated as the mean of *n* values ± SD. The two-tailed Student's *t* test for unpaired samples was used

to determine, compared to the control strains, the statistical significance of the changes in the ratio of the fluorescence intensities between the tip and the most apical nucleus. GraphPad Prism (version 8.0.1) was used to carry out statistical analyses and to draw scatter plots.

## Protein extraction and immunodetection

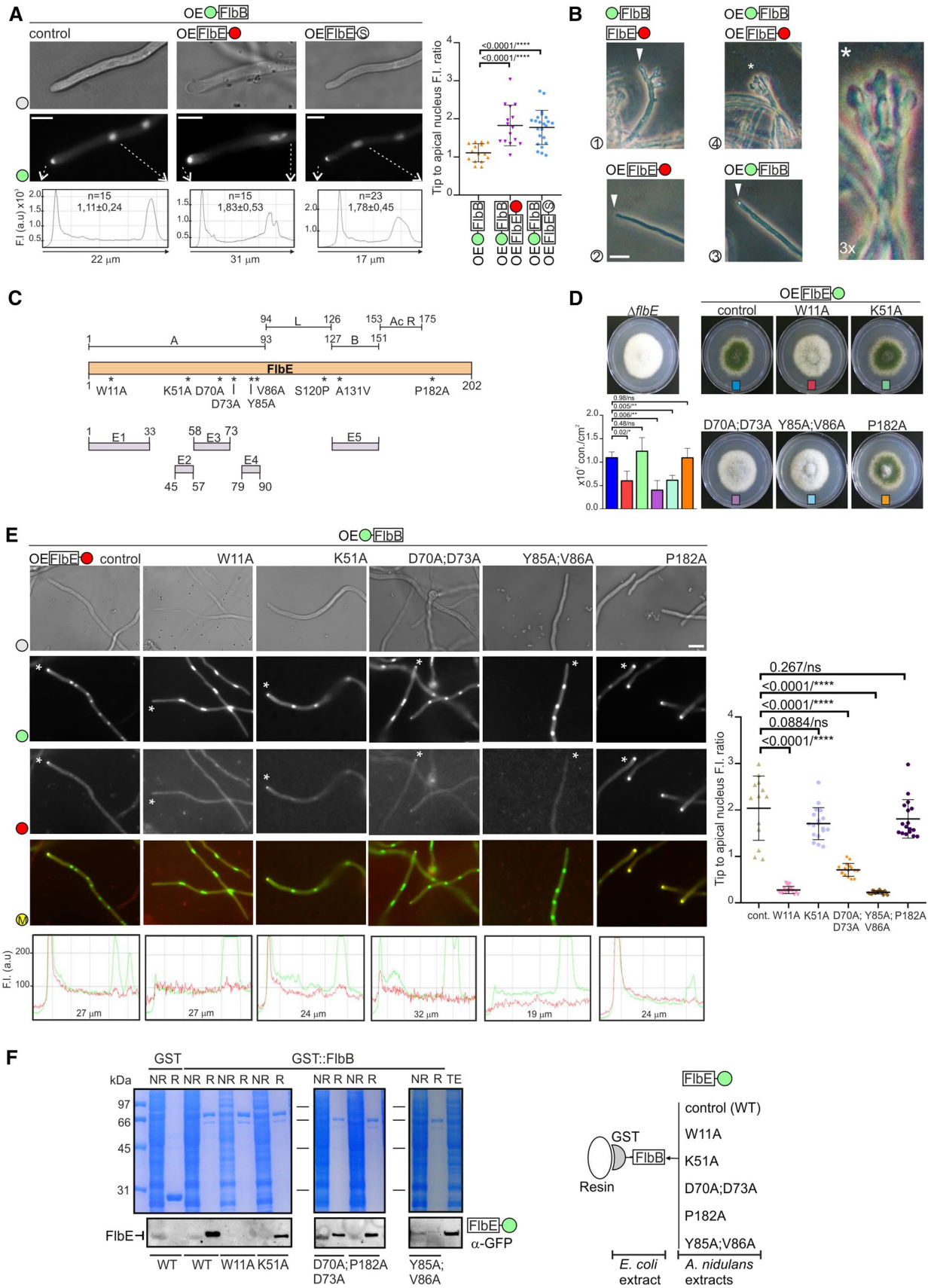
Two different protocols were used for protein extraction. Direct immunodetection of proteins was done using protein extracts that were obtained through the alkaline lysis protocol [44], which prevents protein degradation. Briefly, approximately 6 mg of lyophilized mycelium was resuspended in 1 ml lysis buffer (0.2 M NaOH, 0.2% β-mercaptoethanol). After trichloroacetic acid (TCA) precipitation, 100 μl Tris-Base (1 M) and 200 μl of loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 2% SDS (p/v), 5% β-mercaptoethanol (v/v), 6 M urea and 0.05% bromophenol blue (p/v)) were added. Samples were then loaded on polyacrylamide gels (%10) for protein-content assessment and Western blot analysis.

For pull-down assays, protein extracts were obtained through the procedure described by [45]. Samples were lyophilized and pulverized before the addition of 1 ml of NP-40 extraction buffer (5 mM Hepes pH=7.5, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 0.1% NP-40, 0.5 mM DTT and a protease inhibitor cocktail from Roche; plus 150 mM NaCl when the extract was going to be incubated with Chromotek's RFP-Trap beads). The Bradford assay was used for the determination of protein concentration. Before the use of crude extracts in pull-down assays, 200 μg of protein was precipitated with TCA and purified with ethanol/eter mixes (1:1 and 1:3, respectively). After resuspension in 80 μl of loading buffer, the integrity of samples was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis while expression of the chimera of interest was confirmed by Western blot.

For immunodetection analyses, proteins were separated in standard 10% SDS–polyacrylamide gels before electrotransferring them to nitrocellulose filters. GFP-, mRFP- or HA<sub>3x</sub>-tagged proteins were detected with α-GFP (mouse), α-RFP (rabbit) or α-HA<sub>3x</sub> (mouse) monoclonal antibody cocktails (1:5000 Roche, 1:4000 USBiological and 1:1000 Santa Cruz, respectively). Peroxidase-conjugated α-mouse or α-rabbit (1/4000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, or 1:10000, Sigma-Aldrich, respectively) were used as secondary antibody. Peroxidase activity was induced with Amersham Biosciences ECL kit, and chemiluminescence was detected using 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 (1–426) or point-mutant (C272A, C382A and



**Fig. 1** Domains E1, E3, and E4 of FlbE are necessary for the apical localization of FlbB. **a** Subcellular localization of GFP::FlbB in *gpdA<sup>mini</sup>(OE)::GFP::FlbB* (control), *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB;gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::mRFP* and *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB;gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::Stag* strains. Micrographs of representative hyphae (top row) are shown and corresponding fluorescence detection of FlbB (middle row) for each construct. The graphs below show the intensity of green fluorescence in the region delimited by the set of dotted arrows. The values in the upper part of each graph show the fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus, as the average of 15 or more measurements for each strain plus SD. Scale bar = 5  $\mu$ m. The variability in the size of nuclei is related to the stage of the life cycle. G1 nuclei are round and smaller than late-G2 nuclei [70]. The scatter plot on the right shows the values of green fluorescence intensity ratios measured for each strain and *p* values. Hereafter, the number of stars flag different levels of statistical significance (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001). Co-upregulation of *flbB* and *flbE* increases the apical pool of FlbB. **b** Phenotype of (1) GFP::FlbB;FlbE::mCh, (2) *gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::mRFP*, (3) *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB*, and (4) *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB;gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::mRFP* strains after 26 h of culture in liquid AMM. Micrographs show that only the double-*gpdA<sup>mini</sup>* strain (panel 4) developed conidiophores (marked with asterisk), which are also shown in the 3 $\times$  amplification on the right. Scale bar = 10  $\mu$ m. **c** Predicted functional domains within FlbE, based on the analyses described by [36] (above) and [47] (below). A and B are the main conserved domains differentiated by [36], which were separated by a non-conserved region defined as linker (L). AcR designates a C-terminal region of FlbE which includes multiple acidic, mainly aspartic, amino acids. E1–E4 are domains defined through HMM analyses within domain A, while B was renamed as E5 [47]. **d** Phenotype of point *flbE*\* mutants in 5.5-cm plates filled with AMM after 72 h of culture at 37 °C. The graph shows conidia counts per cm<sup>2</sup> for each mutant (bar colors keyed to photos). Values are given as the mean of three replicates plus SD. *p* values are given and statistically significant (*p* < 0.05) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of panel a; ns: non-significant). **e** Subcellular localization of *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB* (wild-type form) and *gpdA<sup>mini</sup>::FlbE\*::mRFP* (mutant forms) in vegetative hyphae (the wild-type form is shown as control). Row 1, micrographs of representative hyphae; row 2, fluorescence detection of FlbB; row 3, fluorescence detection of FlbE; row 4, merge of both channels. Scale bar = 5  $\mu$ m. The graphs in row 5 show red and green fluorescence intensities (arbitrary units) in hyphal segments covering the region between the tip and the most apical nucleus (asterisks in single channel images indicate which hyphae have been analyzed). The scatter plot on the right shows the values of GFP::FlbB fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured for each strain, with associated *p* values. Statistically significant (*p* < 0.05) relations are indicated with asterisks (see legend of panel a; ns: non-significant). Mutations within domain E1, E3, and E4 significantly decrease the quantity of FlbB at tips of hyphae. **f** Pull-down assays using bacterially expressed (*E. coli*) GST (negative control) and GST::FlbB forms and crude extracts from *A. nidulans* strains expressing wild-type or mutant *gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::GFP* forms W11A, K51A, D70A;D73A, Y85A;V86A and P182A. Polyacrylamide gels stained with Coomassie blue are shown as loading controls. TE: Total protein extract of *A. nidulans*. NR and R: Fractions of the *A. nidulans* protein extracts not retained or retained by GST or the GST::FlbB chimera. On the right, a diagram of the experiment. See also Fig. S1

C272A; C382A) versions of FlbB. After culturing transformant *E. coli* DH1 cells until OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8, expression of GST-tagged proteins was induced with the addition

of 0.1 mM IPTG and further incubation at 15 °C for 24 h. Extracts containing recombinant GST chimeras were then obtained essentially as described by us previously [23]. Briefly, bacterial cells were pelleted by centrifugation and subsequently resuspended in PBS buffer (150 mM NaCl, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) plus a protease inhibitor cocktail tablet (Roche). Cells were lysed by sonication (12 pulses of 30 s, each followed by additional 30 s on ice) and samples were centrifuged. The supernatants were used in pull-down assays.

## Pull-down assays

Two procedures were followed. The first one analyzed the ability of the above-mentioned GST-tagged FlbB chimeras, used as baits, to retain wild-type and mutant forms of FlbE::GFP [23]. Briefly, GST-tagged proteins attached to glutathione Sepharose media (GE Healthcare) were incubated at 4 °C for 1 h with 2–3 mg of crude protein extracts of *A. nidulans*. After 3–5 washing steps (a sample of this non-retained, NR, fraction was stored for analysis), loading buffer was used to resuspend the resin (retained fraction, R). Proteins were visualized with the Bio-Safe Coomassie stain (Bio-Rad), and tagged proteins were specifically detected by immunodetection.

In the second procedure, 25  $\mu$ l of RFP-Trap beads (Chromotek) was washed twice by centrifugation at 2500g and 4 °C with 500  $\mu$ l dilution buffer (5 mM Hepes pH = 7.5, 150 mM NaCl and 0.5 mM EDTA) and incubated with 6 mg of the protein extract for 90 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was precipitated in TCA, resuspended in loading buffer and stored as the non-retained (NR) fraction. The resin was then washed three times using protein extraction buffer plus 150 mM NaCl (see before) and finally resuspended in loading buffer (R: retained fraction). Both NR and R fractions were resolved by SDS-PAGE electrophoresis.

## Results

### Constitutive upregulation of *flbE* increases the apical concentration of FlbB and induces conidiation in liquid culture

FlbB accumulates at the tip of vegetative hyphae and shows a concentration gradient in nuclei, with the highest concentration found in the most apical nucleus and steadily decreasing quantities in successive nuclei [32]. Constitutive expression of a GFP::FlbB chimera driven by the *gpdA<sup>mini</sup>* promoter [46] increases the nuclear pool of FlbB, with all nuclei being filled with more or less equal amounts of the TF [23]. However, this excess in the nuclear pool of FlbB does not correlate with an increase in conidia production because

it corresponds to a transcriptionally inactive form of this TF. The absence of the FlbB-interactor protein FlbE precludes accumulation of FlbB at the tip, linking the activation of FlbB to its transport to and/or accumulation at the growth region as well as the presence of FlbE [23, 36].

To determine whether the apical concentration of FlbB is directly dependent on the quantity of FlbE available, we constitutively expressed FlbE::mRFP or FlbE::Stag fusions, each driven by the *gpdA<sup>mini</sup>* promoter (integrated at the *flbE* locus; see Fig. S1a), in a *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB* strain. Both dual overexpression (OE) strains showed a statistically significant increase in the apical fluorescence intensity of GFP::FlbB compared to the parental *gpdA<sup>mini</sup>::GFP::FlbB* strain (Fig. 1a). The green fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus increased significantly from  $1.11 \pm 0.24$  in the control to  $1.78 \pm 0.45$  in the FlbE::Stag strain and  $1.83 \pm 0.53$  in the FlbE::RFP strain ( $n \geq 15$  hyphae for each strain;  $p = 6.3 \times 10^{-6}$  and  $5.5 \times 10^{-5}$ , respectively). These results strongly suggest that the concentration of FlbB at the hyphal apex is tightly linked to the concentration of FlbE.

Next, we checked if this higher apical accumulation of FlbB and FlbE was accompanied by higher conidia production and/or premature induction of conidiation (Fig. 1b, Fig. S1b). On solid medium, wild-type strains conidiate because hyphae are exposed to the air environment [20]. The three strains produced similar amounts of conidia ( $n = 3$  for each strain;  $p = 0.41$  and  $0.59$ , when mRFP- or S-tagged strains were compared to the reference strain) (Fig. S1b). Clear differences arose, however, after 26 h of culture in liquid medium compared to the following three reference strains (Fig. 1b): (1) a strain expressing GFP::FlbB and FlbE::mCherry chimeras, each driven by its respective native promoter; (2) a strain expressing a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE::RFP chimera; or (3) a strain expressing a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven GFP::FlbB chimera. While, as expected, reference strains formed only vegetative hyphae (triangles in Fig. 1b), the double-*gpdA<sup>mini</sup>* strain produced conidiophores (the asexual structures bearing conidia) composed of all the characteristic cell types (asterisk in Fig. 1b). Results strongly suggest that the apical accumulation of FlbB is directly dependent on FlbE concentration, and that a higher accumulation of the FlbB/FlbE signaling complex at the tip correlates, under certain growth conditions, with the ability to induce conidiation prematurely.

## Domain analysis of FlbE

Due to the key role of FlbE in the apical accumulation of FlbB and, consequently, the control of conidiation, we proceeded with a deeper characterization of functional domains in FlbE. Preliminary analysis of the FlbE sequence revealed the presence of two main domains (Fig. 1c) [36]. Motif A

spans from residue M1 to I93, and motif B resides between residues R127 and P151. Both regions were connected by a non-conserved linker sequence (94–126). The C-terminal region of FlbE, comprising residues from D153 to S202, showed a concentration of acidic, mainly aspartic, residues in the domain between D153 and D175, which are relatively conserved in most orthologs [36, 47]. In contrast, the region between G176 and S202 showed no conservation among FlbE orthologs.

A more detailed Hidden Markov Model (HMM) analysis divided motif A into four conserved regions: E1 (1–33), E2 (45–57), E3 (58–73) and E4 (79–90) (domain B, positions 127–151, was renamed as E5 in this scheme) (Fig. 1c) [47]. Specific residues within conserved domains were selected for alanine replacement. Due to its absolute conservation in FlbE orthologs [47], W11 was selected to study the role of domain E1. As a potential ubiquitination target [48], K51 was selected within domain E2. D70 and D73 were also mutated as they might contribute to a polyproline helix structure in domain E3. Y85 and V86, respectively, which are located within a predicted hydrophobic cluster in domain E4 and are highly conserved within FlbE orthologs, were also selected. Finally, and due to the characteristic conformational restrictions imposed by prolines, P182 was selected in the poorly-conserved C-terminal region. We had previously described that mutation S120P within the linker region and an A131 V substitution within domain E5 both caused delocalization of FlbE from the tip and, consequently, a *fluffy* aconidial phenotype [36]. Thus, they were not included in the current analysis.

First, a strain expressing a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE::GFP chimera was generated following the same procedure as that shown in Fig. S1a. Using its genomic DNA as a template, we proceeded with the site-directed mutagenesis approach described in Fig. S1c, to generate strains of *A. nidulans* expressing the *gpdA<sup>mini</sup>*-driven mutant FlbE::GFP forms described above. The replacement of the targeted amino acid and accuracy of *flbE* sequence were confirmed by sequencing of the complete open reading frame. The phenotype of the strains and the subcellular localization of the mutant chimeras were then analyzed (Fig. 1d; Fig. 1e for mRFP-tagged mutant FlbE forms; Fig. S1d for GFP-tagged counterparts). Mutations K51A and P182A did not alter conidia production ( $p > 0.05$  compared to the parental wild-type strain;  $n = 3$  replicates for each strain) nor FlbB/FlbE localization. The fact that P182A mutation did not inhibit conidia production or FlbE/FlbB localization probably reflects that hypothetical folding induced by this residue is not essential for FlbE functionality.

Mutations W11A, D70A;D73A and Y85A;V86A caused an aconidial phenotype, with significantly reduced conidia production compared to the parental strain (Fig. 1d). The wild-type *gpdA<sup>mini</sup>::FlbE::GFP* strain produced  $1.1 \times$

$10^7 \pm 1.2 \times 10^6$  conidia/cm<sup>2</sup> while W11A, D70A;D73A and Y85A;V86A mutants produced  $4.1\text{--}6.2 \times 10^6 \pm 0.9\text{--}2.0 \times 10^6$  conidia/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.020$ ,  $0.006$  and  $0.005$ , respectively, in the three replicate experiments, with  $n = 3$  replicates for each strain). Additionally, we observed differences in FlbE localization among these mutants. While W11A and Y85A; V86A mutations caused the absence of FlbE from the hyphal tip and a dispersion along the cytoplasm, *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE<sup>(D70A;D73A)::GFP</sup> (or  $-mRFP$  tagged) still accumulated at the tip (Fig. 1e, Fig. S1d). However, due to the *fluffy* phenotype of the strain, it can be inferred that this apical form of FlbE is not fully functional or is not accumulated at the tip above a hypothetical threshold concentration (Fig. 1d). In general, FlbB localization correlated with that of FlbE, being delocalized from the tip in W11A and Y85A; V86A mutants but not completely in the D70A;D73A mutant (Fig. 1e; note also in Fig. S1e the localization of a GFP::FlbB chimera driven by the native *flbB* promoter in a strain co-expressing a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE<sup>(D70A;D73A)::mRFP</sup> chimera). The GFP::FlbB fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus decreased from  $2.04 \pm 0.69$  in the reference strain ( $n = 13$ ) to  $0.28 \pm 0.08$  and  $0.23 \pm 0.04$  in W11A and Y85A; V86A mutants of FlbE ( $n = 16$  and  $15$ , respectively;  $p = 1.1 \times 10^{-10}$  and  $1.6 \times 10^{-10}$ ) and to  $0.71 \pm 0.14$  in the D70A; D73A mutant ( $n = 16$ ;  $p = 4.4 \times 10^{-08}$ ). All *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE::GFP chimeras were detected by immunodetection and showed the same mobility on Western blots (Fig. S1f).

Finally, all mutant forms of FlbE were tested in pull-down assays against a bacterially expressed GST::FlbB form (Fig. 1f). The results correlated with the localization of FlbE/FlbB. Those mutations within FlbE inhibiting the apical localization of FlbE/FlbB also showed inhibition of the *in vitro* interaction with GST::FlbB while those not affecting apical localization exhibited the interaction.

### Domain E1 is essential but insufficient for the apical localization of FlbB and FlbE

Next, we focused on domain E1 because this region was predicted to be a signal peptide in the AspGD ([www.aspgd.org](http://www.aspgd.org)) database based on Interpro [49] search results. As a preliminary approach to investigate its possible function, the wild-type FlbE sequence was tagged with GFP at the N-terminus and expressed driven by the native *flbE* promoter (see the tagging procedure in Fig. S2a). N-terminal GFP tagging of FlbE caused an aconidial phenotype that was the consequence of the delocalization of FlbE from the tip (Fig. 2a, b). As stated before, this result contrasts with the wild-type functionality observed for a C-terminal fluorescent tagged FlbE constructs (Fig. 1 and S1). A similar aconidial phenotype and delocalization of FlbE from the tip were observed in cells of a strain expressing the truncated FlbE<sup>(34–201)::GFP</sup>

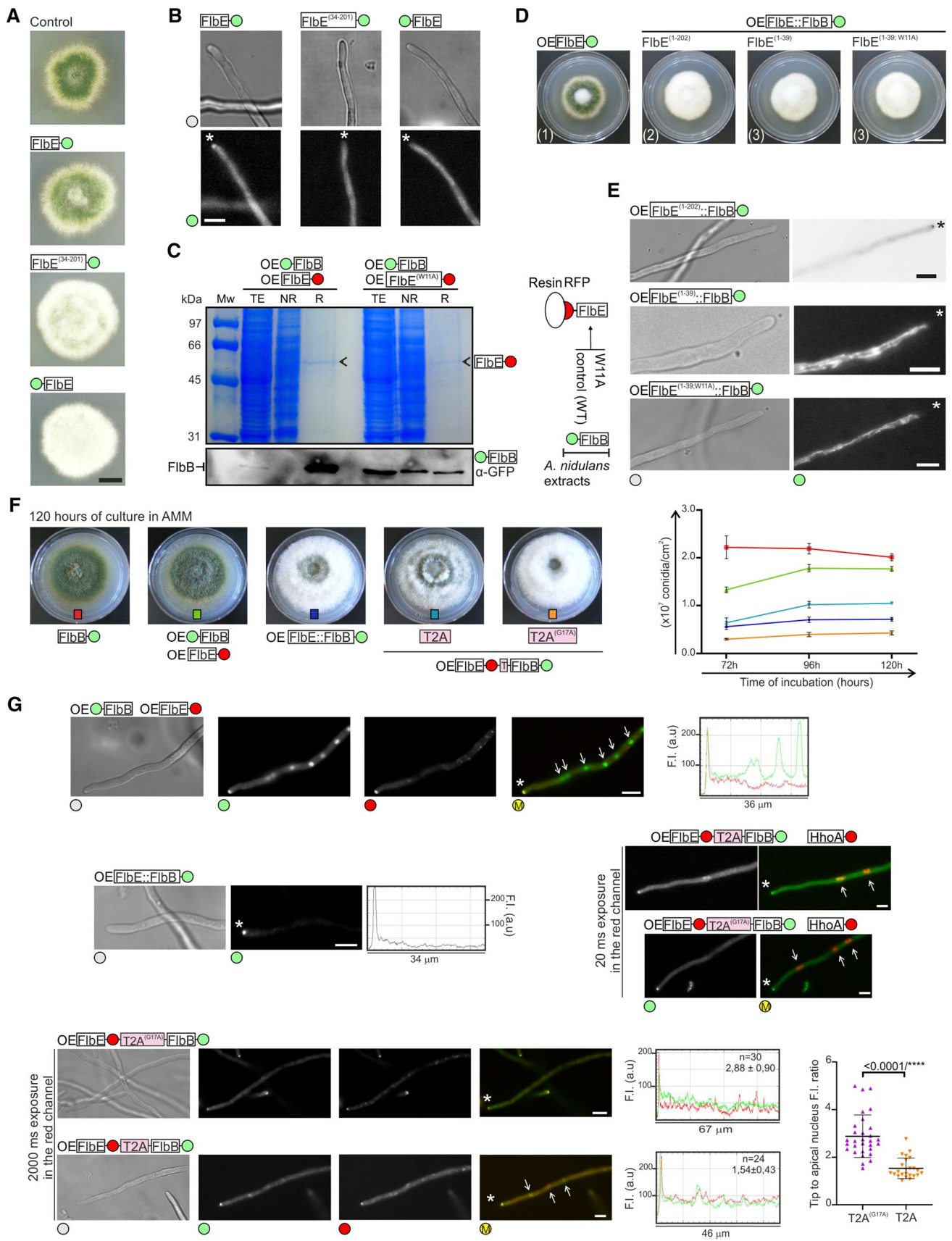
form lacking the putative signal peptide (Fig. 2a, b and S2b). These results show the importance of domain E1 in the function of FlbE in the cell.

Mislocalization of FlbE with a N-terminal GFP tag may be related to failure of any attempt to show an interaction between a bacterially expressed GST::FlbE chimera (used as bait) and FlbB::HA<sub>3x</sub> (Fig. S2c). Behavior of this type of construct could be due to interaction between the GFP moiety and parts of the FlbE sequence or its interference with localization motifs. However, a pull-down experiment performed with FlbE::mRFP shows that it can be used successfully as bait, retaining GFP::FlbB when it is in the wild-type form but not when it bears the W11A mutation within domain E1 (Fig. 2c).

To determine whether domain E1 is sufficient to target FlbB to the tip of hyphae, three DNA constructs were generated. One of them contained the entire FlbE protein tagged in the C-terminus with an FlbB::GFP chimera (Fig. S2d). Second and third constructs bore only the putative signal peptide of FlbE (amino acids from 1 to 39) fused to FlbB::GFP, but the third one included the mutation W11A (FlbE<sup>(1–39; W11A)::FlbB::GFP</sup>) (Fig. S2e). All of them were driven by *gpdA<sup>mini</sup>*. Protoplasts of a  $\Delta flbB$  strain were transformed and recombination of DNA constructs was selected at the *flbE* locus, so as to guarantee that the only source of FlbB and FlbE was the one derived from the translation of the constructs. Correct recombination of the constructs was confirmed by Southern-blot and the correctness of the reading frame in the transition from *flbE* to *flbB* sequences was confirmed by genomic sequencing. All transformants showed the characteristic aconidial phenotype of the null *flbE* strain (Fig. 2d). Protein chimeras of the expected size were detected in all strains by immunodetection (Fig. S2f).

The fluorescence of the FlbE::FlbB::GFP chimera was detected at the tip of hyphae, suggesting that it can meet all requirement for utilization of the acropetal transport pathway (Fig. 2e). Despite the constitutive overexpression provided by the *gpdA<sup>mini</sup>* promoter in this chimera, it was not detected in nuclei ( $n = 45$  hyphae). Considering the *fluffy* phenotype of the strain, it can be hypothesized that FlbB cannot be released from the tip, inhibiting its basipetal transport and thus the transcriptional control of *brlA* in nuclei. In contrast, chimeras bearing only domain E1 of FlbE accumulated in cytoplasmic filamentous structures (Fig. 2e) but not at the apex. These results showed that domain E1 of FlbE is not sufficient to target FlbB to the tip and highlighted the importance of additional regions of FlbE for apical localization, such as domains E4, E5, the linker region (see above; [36]), and even domain E3.

To further investigate the hypothetical requirement of an inhibition of the interaction between FlbB and FlbE to initiate basipetal transport of the former, additional FlbE chimeras were generated and expressed in a  $\Delta flbB$  background.



**Fig. 2** Delimiting the interaction between FlbB and FlbE in hyphae. **a** Phenotypes of wild-type (control), FlbE::GFP, FlbE<sup>(34–201)</sup>::GFP and GFP::FlbE strains in adequately supplemented AMM plates after 48 h of culture at 37 °C. Scale bar = 1 cm. **b** Subcellular localization of FlbE::GFP, FlbE<sup>(34–201)</sup>::GFP and GFP::FlbE chimeras in vegetative hyphae. Top row, micrographs; bottom row, fluorescence detection of corresponding fields. Asterisks indicate tips. Scale bar = 5 μm. The apical localization of FlbE is lost when domain E1 of FlbE is deleted or when a wild-type FlbE form is tagged in the N-terminus. **c** Pull-down assay using *gpdA<sup>mini</sup>*-driven endogenous FlbE::mRFP (left) or FlbE<sup>(W11A)</sup>::mRFP (right) chimeras as baits. The western-blot below shows the levels of GFP::FlbB (co-expressed with the FlbE chimeras) in total extracts as well as non-retained (NR) and retained (R) fractions. A polyacrylamide gel stained with Coomassie blue is shown as control. OE, overexpression construct. Wild-type FlbE, but not the W11A mutant, is able to pull down FlbB. A schematic of the experiment is shown on the right. **d** Phenotype of strains expressing *gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE::GFP (reference), FlbE<sup>(1–202)</sup>::FlbB::GFP, FlbE<sup>(1–39)</sup>::FlbB::GFP and FlbE<sup>(1–39;W11A)</sup>::FlbB::GFP chimeras after 72 h of culture at 37 °C in 5.5 cm plates filled with MMA. All strains are overexpression constructs (OE). Scale bar = 2 cm. Numbering corresponds to the samples in the western-blot in Fig. S2f. **e** Subcellular localization of the chimeras of panel D in vegetative hyphae. Micrographs of representative hyphae are shown on the left with corresponding fluorescence detection on the right. Asterisks indicate tips. Scale bar = 5 μm. OE, overexpression construct. The FlbE<sup>(1–202)</sup>::FlbB::GFP chimera accumulates at the tip of hyphae but not in nuclei. **f** Phenotype of strains expressing T2A peptide-containing FlbB and FlbE chimeras (wild-type or the G17A mutant) after 120 h of culture in 5.5 cm plates filled with AMM. Strains expressing FlbB::GFP, FlbE::mRFP and GFP::FlbB, and FlbE::FlbB::GFP chimeras were used as controls. OE, overexpression constructs. The graph on the right shows conidia production (conidia/cm<sup>2</sup>) for the same strains. Values for each strain are given as the mean of three replicates plus SD at three timepoints. The strain expressing the wild-type T2A FlbE::FlbB chimera (light blue tagged image) shows a phenotype between that of wild-type control strains (red and green tagged images, respectively) and the strains expressing the mutant form (G17A) of T2A and the FlbE::FlbB chimera (orange and dark blue tagged images, respectively). **g** Micrographs (left) and fluorescence images corresponding to hyphae of strains expressing GFP::FlbB and FlbE::mRFP, FlbE::FlbB::GFP, FlbE::mRFP::T2A::FlbB::GFP and FlbE::mRFP::T2A<sup>(G17A)</sup>::FlbB::GFP chimeras. Asterisks indicate hyphal tips and arrows indicate nuclei. The graphs on the right of each group of images show red and green fluorescence intensities (arbitrary units) in hyphal segments covering the indicated length. OE, overexpression constructs. Scale bars = 5 μm. The scatter plot (bottom-right) shows a plot of the green fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus for strains expressing mutant (G17A) or wild-type forms of T2A. The use of the wild-type T2A form partially restores the nuclear accumulation of FlbB. HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm the nuclear accumulation of FlbB in the strain expressing the wild-type form of T2A (20 ms of exposure time in the red channel; middle-right). See also Fig. S2

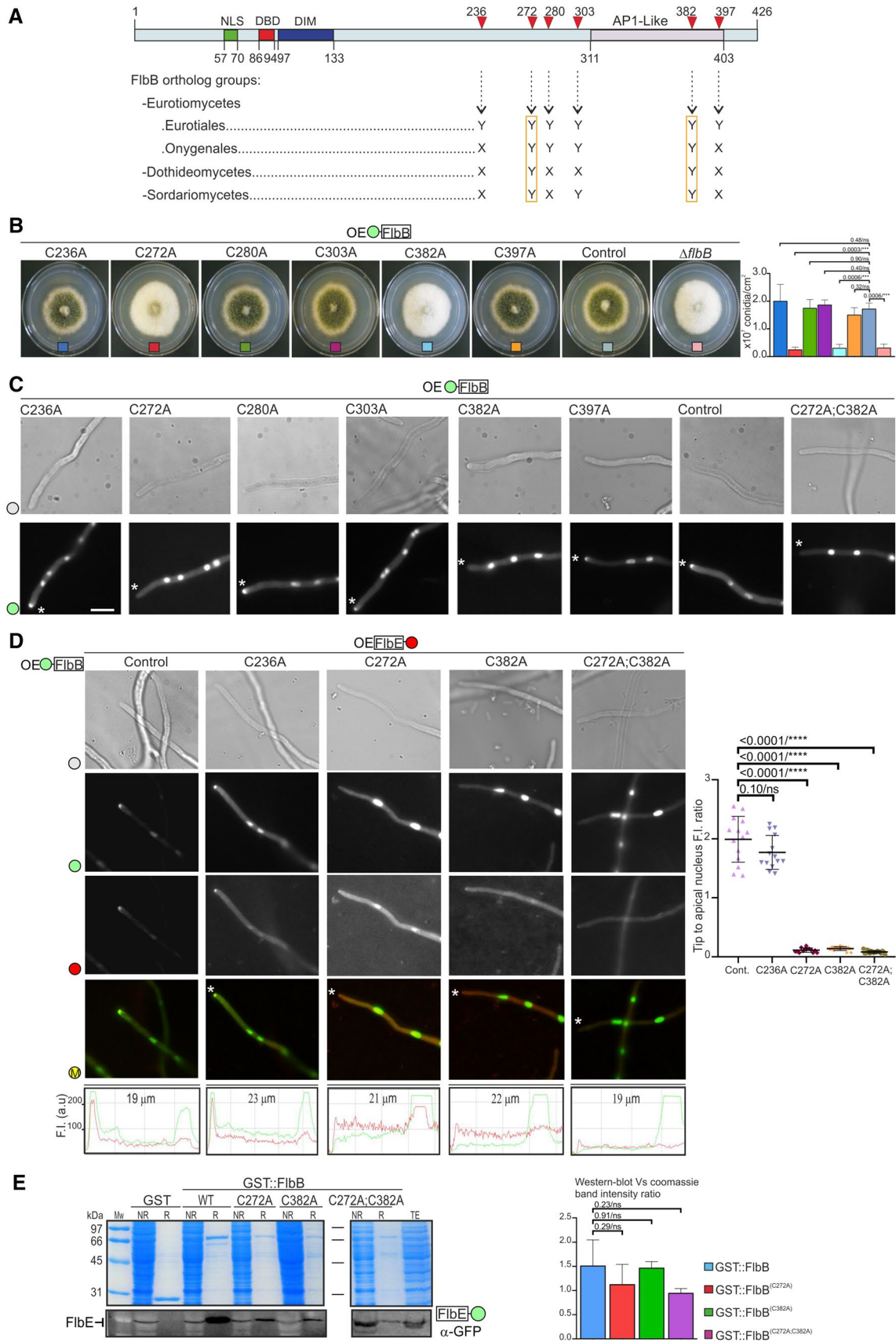
Constructs were integrated in the *flbE* locus (as above). Transformant strains expressed a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven chimera consisting of FlbE::mRFP fused to and in frame with FlbB::GFP through a wild-type or a mutant short sequence corresponding to the viral peptide T2A (EGRGSLTCDVEENPGP or EGRGSLTCDVEENPAP, respectively) (Fig. S2 g). During translation of the mRNA, T2A induces

the cleavage of the peptide at its last codon (G17-P18) but without blocking translation, which continues until the stop codon of the construct [50]. The maintenance of the correct reading frame was confirmed by sequencing and the synthesis of chimeras of the expected size by immunodetection (Fig. S2 h). Peptides with sizes corresponding to FlbE::mRFP and FlbB::GFP were detected in strains expressing the wild-type T2A sequence. However, bands corresponding to the uncleaved, full-length chimera were also detected, as in the case of strains bearing the mutant T2A<sup>(G17A)</sup> sequence. This suggested that the efficiency of T2A in our system was partial. Accordingly, the strains with the wild-type T2A sequence partially restored conidia production to levels between those of wild-type and acnidial reference strains (Fig. 2f). Those results correlated with the subcellular localization of FlbB. When the wild-type T2A peptide was expressed, FlbB recovered nuclear localization but in the form of a weak gradient, despite being expressed driven by *gpdA<sup>mini</sup>* (HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm the nuclear accumulation of the TF) (Fig. 2g). In this case, the fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus decreased from  $2.88 \pm 0.90$  in strains expressing the mutant T2A<sup>(G17A)</sup> form to  $1.54 \pm 0.43$  when the wild-type T2A form was expressed ( $p = 0.00000012$ ;  $n = 30$  and 24 hyphae for each strain, respectively; see the scatter plot in Fig. 2g). Overall, results in this section extend our previous model showing that the apical interaction between FlbB and FlbE is in all probability inhibited to initiate the basipetal transport of the TF.

### Apical accumulation of FlbB and FlbE, but not their interaction, requires cysteines 272 and 382 of FlbB

The central and C-terminal domains of FlbB are essential for its accumulation at the tip and the induction of conidiation under standard culture conditions [23]. Previous results showed that the substitution of Cys382 by an alanine, but not that of Cys397, inhibits conidiation and the apical accumulation of both FlbB and FlbE [23]. FlbB contains four additional Cys residues within these domains, Cys236, 272, 280 and 303 (Fig. 3a), which show higher or lower conservation within FlbB orthologs [47].

To assess the importance of these additional four cysteines in FlbB and FlbE dynamics and functionality, we followed the mutagenesis procedure described in Fig. S3a to construct a set of mutants where each was substituted with an alanine. All mutant constructs were driven by the *gpdA<sup>mini</sup>* promoter. As can be seen in Fig. 3b, only the alanine substitutions of Cys272 and Cys382 inhibited conidiation and caused a *fluffy* phenotype as observed previously with the Cys382Ala mutant or the null *flbB* strain. Moreover, conidia production was decreased in only these two strains ( $2.5\text{--}3.2 \times 10^6 \pm 0.9\text{--}1.3 \times 10^6$  conidia/cm<sup>2</sup> in Cys272Ala,





**Fig. 3** Cysteines in positions 272 and 382 of FlbB are necessary for the apical localization of FlbB and FlbE. **a** Diagram showing the position and conservation of the six cysteines within FlbB. “Y” indicates conservation while “X” indicates no conservation. Based on Cortese et al. [47]. **b** Phenotype of the strains expressing *gpdA<sup>mini</sup>* (OE)-driven GFP::FlbB Cys-to-Ala mutant chimeras, on 5.5 cm plates filled with AMM after 72 h of culture at 37 °C. The graph on the right quantifies conidia produced by each strain (per cm<sup>2</sup>), as the mean of three replicates plus SD. *p* values are given and statistically significant (*p* < 0.05) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of Fig. 1a; ns: non-significant). Only FlbB mutants in positions 272 or 382 show an aconidial phenotype. **c** Representative micrographs (top row) and green fluorescence images (bottom row) showing the subcellular localization of *gpdA<sup>mini</sup>* (OE)-driven mutant GFP::FlbB<sup>(Cys-to-Ala)</sup> chimeras in vegetative hyphae. Tips are indicated by asterisks. Scale bar = 5 μm. **d** Subcellular localization of GFP::FlbB and FlbE::mRFP in those FlbB<sup>(Cys-to-Ala)</sup> mutants showing a *fluffy* phenotype (Cys272Ala, Cys382Ala, and Cys272Ala; Cys382Ala). The reference wild-type strain and the Cys236Ala mutant were used as controls. Row 1, micrographs of representative hyphae; row 2, fluorescence detection of FlbB; row 3, fluorescence detection of FlbE; row 4, merge of both channels. OE, overexpression constructs. The graphs at the bottom correspond to hyphae indicated by an asterisk and show green and red fluorescence intensity (arbitrary units) along hyphal segments covering the tip and the most apical nucleus. Scale bar = 5 μm. The scatter plot on the right shows the values of GFP::FlbB fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured for each Cys-to-Ala mutant of FlbB analyzed in this panel. *p* values are given and statistically significant (*p* < 0.05) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a; ns: non-significant). Substitution of Cys272 or Cys382 of FlbB by alanines inhibits the accumulation of the transcription factor at the tip of hyphae. **e** Pull-down assays between bacterially expressed (*E. coli*) GST::FlbB forms (wild-type and those Cys-to-Ala mutants causing a *fluffy* phenotype) and crude protein extracts from a strain expressing FlbE::GFP. NR: not-retained fraction. R: retained fraction. The graph on the right shows the intensity ratios between western-blot and coomassie bands for each assay. The values are the mean of three replicates plus SD. *p* values are given (*ns* non-significant). The mutations analyzed in this panel do not cause a significant inhibition of the ability of FlbB to pull-down FlbE. See also Fig. S3

Cys382Ala and null *flbB* strains; *n* = 3 for each strain; *p* = 0.00034, 0.00055 and 0.00056, respectively, in the comparison of *fluffy* strains with the reference wild-type strain) compared to the wild-type level of production observed in strains expressing wild-type, Cys236Ala, Cys280Ala, Cys303Ala and Cys397Ala GFP::FlbB chimeras ( $1.5\text{--}1.9 \times 10^7 \pm 0.2\text{--}0.6 \times 10^7$  conidia/cm<sup>2</sup>) (Fig. 3b). All chimeras could be detected by Western blot and showed the same electrophoretic mobility (Fig. S3b; strains integrating one or two copies of the mutant plasmids were analyzed). The aconidial phenotype of those Cys-to-Ala mutants correlated with the absence of FlbB and FlbE from the tip (Fig. 3c, d). The green fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus decreased from  $1.99 \pm 0.39$  or  $1.77 \pm 0.28$  in the reference wild-type or Cys236Ala mutant (*n* = 14 hyphae for each strain) to  $0.11 \pm 0.04$ ,  $0.14 \pm 0.03$  and  $0.08 \pm 0.03$  in Cys272Ala, Cys382Ala or Cys272Ala; Cys382Ala mutants (*n* = 13, 17 and 18 hyphae, respectively; *p* <  $2 \times 10^{-15}$  in the

three comparisons with the wild-type reference). Pull-down assays between bacterially expressed wild-type or Cys-to-Ala mutant GST::FlbB forms (Cys272Ala; Cys382Ala or the double mutant Cys272Ala; Cys382Ala) and crude protein extracts of a strain expressing FlbE::GFP (Fig. 3e) suggested that these two Cys residues are not essential for the interaction between these two UDA-s. Thus, the delocalization of FlbB/FlbE from the tip observed in those mutants was not caused by an inhibition of the interaction between both proteins. These results and those shown in previous sections suggest that there is an inter-dependence between FlbB and FlbE for their transport to and accumulation at the tip, and that the incorporation of the complex to the corresponding transport pathway is enabled by specific residues/domains of both proteins (see “Discussion”).

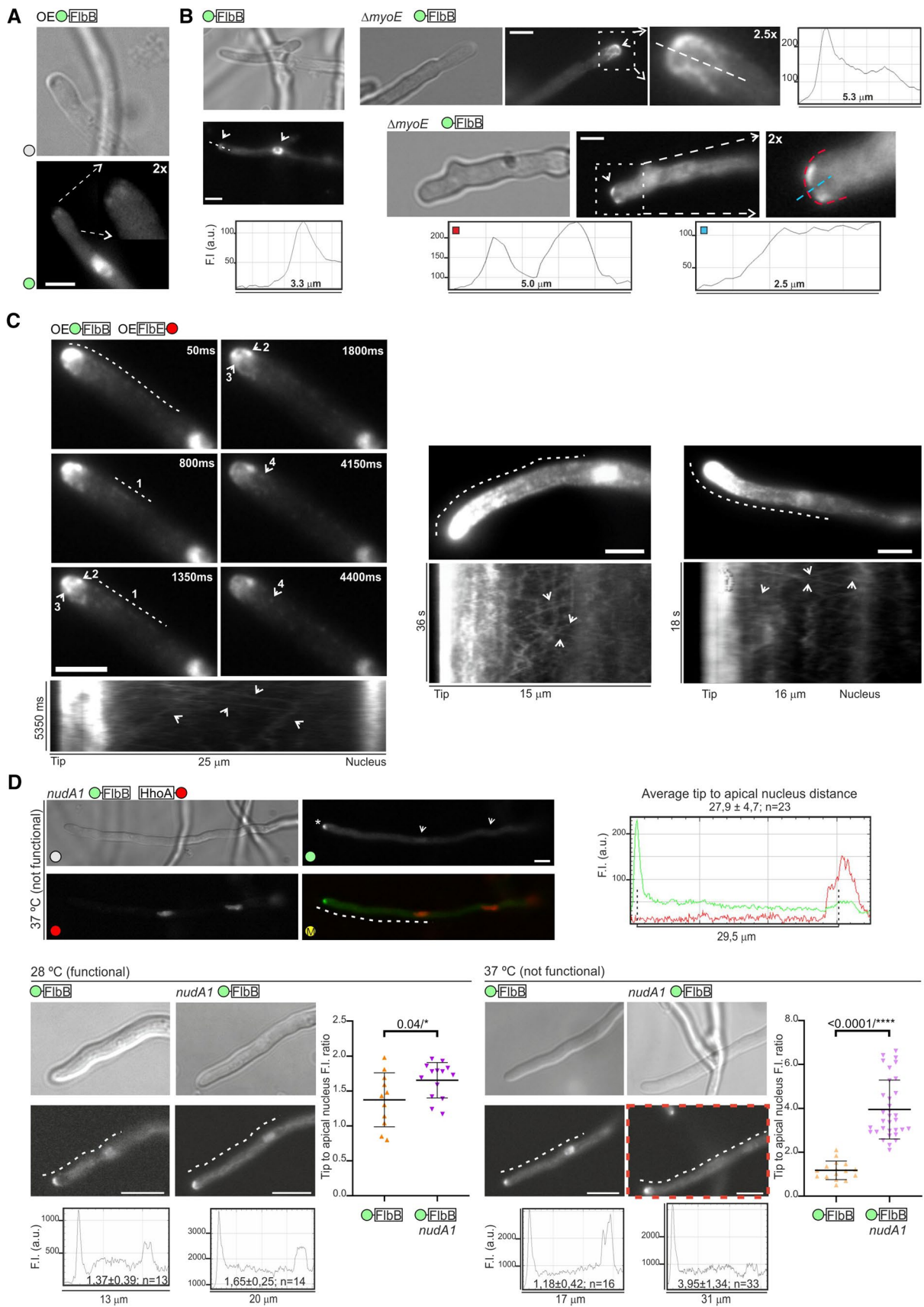
### Apical localization of FlbB is altered in a *ΔmyoE* background

In cells treated with latrunculin B, which prevents actin monomers from polymerizing, a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven GFP::FlbB chimera accumulated in the hyphal subapex but was excluded from the apex ([23]; see also Fig. 4a). This meant that, under those conditions, FlbB could move in an acropetal direction and reach the subapex but failed to progress to the apex. Those results suggested that the final stage of the acropetal transport of FlbB was dependent on actin filaments while the transport to the subapex was not. *A. nidulans* myosin V, MyoE, has been proposed to fuel the actin filament-dependent step of exocytosis [51, 52]. Thus, we generated a *ΔmyoE* mutant that expressed an *flbB<sup>p</sup>*-driven GFP::FlbB chimera and observed that, compared to the wild-type background, FlbB could not gather at the apex and spread into an apical crescent (Fig. 4b). These results suggest that the transport of FlbB from the subapex to the apex occurs through actin filaments and depends on the motor MyoE (see “Discussion”).

### Nuclear accumulation of FlbB is inhibited in a *nudA1* background

To obtain additional information about the dynamics of FlbB at the hyphal tip, we took advantage of the higher apical accumulation of FlbB in the dual-OE strain expressing GFP::FlbB and FlbE::RFP both under the control of *gpdA<sup>mini</sup>* (see the images and kymographs in Fig. 4c; and Supplementary videos S4a-c). Being that the apical concentration of the bZIP was significantly higher in that strain compared to a *gpdA<sup>mini</sup>*::GFP::FlbB strain (see Fig. 1a), we expected that this would enable us to track the movements of FlbB more clearly.

Patches moving in both directions were indeed detected (numbers 1 and 4 in Fig. 4c, left; see also arrowheads in the three kymographs shown; see Supplementary videos S4b,



**Fig. 4** Deletion of *myoE* causes a delocalization of FlbB from the tip while NudA is necessary for the nuclear accumulation of the transcription factor. **a** Micrograph (top) and green fluorescence image (bottom) of a representative hypha of a strain expressing a *gpdA<sup>mini</sup>*-driven (OE, overexpression) GFP::FlbB chimera in a medium containing Latrunculin B (100  $\mu$ m) as an inhibitor of actin filament polymerization. FlbB reaches the subapex of hyphae but not the apex. See Ref. [23]. **b** Tip localization of GFP::FlbB in wild-type and  $\Delta$ *myoE<sup>myoV</sup>* genetic backgrounds. The deletion of *myoE* causes the spreading of GFP::FlbB into an apical crescent instead of accumulating at the apex [52]. Microfilament-like structures decorated with GFP::FlbB were also observed. The graphs to the right or below show the intensity of green fluorescence along the segments indicated by the white, red or blue dotted lines. In all panels, scale bar = 5  $\mu$ m. **c** GFP::FlbB dynamics in three vegetative hyphae of strains co-expressing FlbE::RFP, both under the control of *gpdA<sup>mini</sup>* (OE, overexpression constructs). The six frames shown in the left series were selected from Supplementary video S4a. Time of each frame is indicated in the upper-right corners of the images. The dotted line in the first frame indicates the region analyzed in the kymograph below, which shows patches of GFP::FlbB moving in acropetal and basipetal directions between the tip and the most apical nucleus (number 1). Number 2 indicates a subapical, motionless spot of GFP::FlbB from which basipetal patches depart in frames corresponding to 4150 and 4400 ms (number 4). Finally, number 3 indicates filamentous structures that apparently link the subapex and the apex. The images in the middle and on the right correspond to two hyphae (with corresponding kymographs below) taken from Supplementary videos S4b and S4c. Arrows indicate patches moving in acropetal and basipetal directions. Scale bars = 5  $\mu$ m. **d** Subcellular localization of GFP::FlbB in wild-type and *nudA1* (thermo-sensitive mutant of *nudA*) genetic backgrounds at 28 or 37  $^{\circ}$ C. Top: co-localization of GFP::FlbB and HhoA::mRFP in *nudA1* hyphae at 37  $^{\circ}$ C. The asterisk indicates the tip and arrows nuclei. Scale bar = 5  $\mu$ m. The plot on the right shows the intensity of green and red fluorescence along the region delimited by the dotted line. The average distance between the tip and the most apical nucleus measured for hyphae of this background at the temperature of 37  $^{\circ}$ C is also given ( $n=23$  hyphae). Bottom: row 1, micrographs of representative hyphae of each strain at each temperature. Row 2, green fluorescence images. The graphs in row 3 show the intensity of green fluorescence along the hyphal segments covered by the dotted lines. Plots of the ratios between the intensity of GFP::FlbB fluorescence at the tip and the most apical nucleus are to the right of each series. The dotted red square indicates the loss of nuclear localization of FlbB when NudA activity is inhibited (*nudA1* background at 37  $^{\circ}$ C). Scale bars = 5  $\mu$ m.  $p$  values are given and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of Fig. 1a). Inhibition of NudA activity causes a significant decrease in the nuclear pool of FlbB. See also Supplementary Videos S4a–c

c). A motionless GFP::FlbB spot could be clearly detected at the subapex in Fig. 4c, left (number 2), from which basipetally moving patches departed (number 4; Supplementary video S4a). As the fluorescence intensity decreased as a result of the long exposure times, filament-like fluorescent structures could be observed between the subapex and the apex, (number 3 in Fig. 4c, left; Supplementary video S4a).

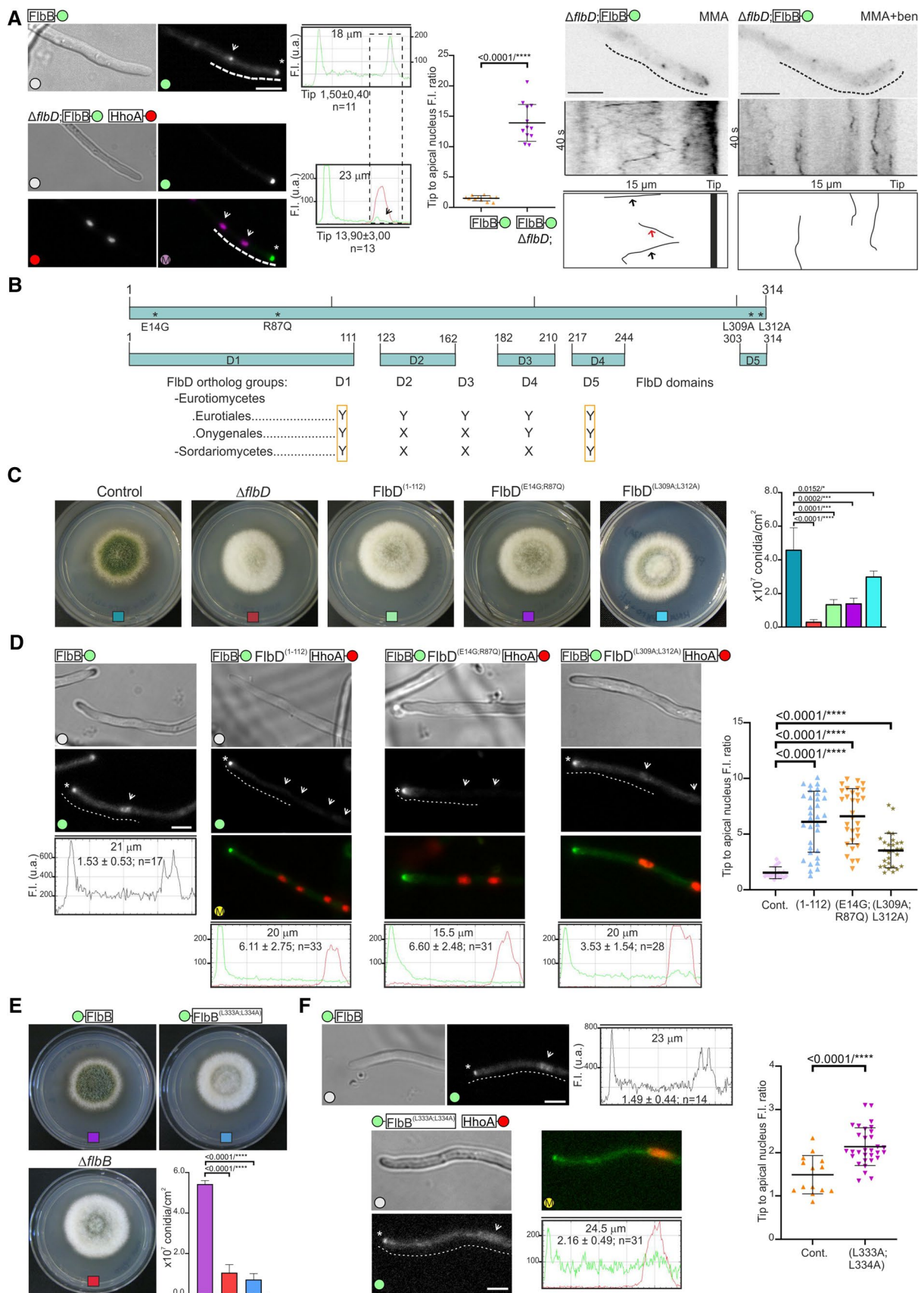
Since the FlbB patches moving towards nuclei seemed to depart from the subapical region corresponding to the dynein loading zone [46], we decided to analyze the nuclear localization of a GFP::FlbB chimera (driven by the native

promoter) in a strain expressing the NudA1 thermo-sensitive form of NudA, the heavy chain of dynein [53]. When wild-type and *nudA1* backgrounds were compared at 28  $^{\circ}$ C (functional NudA1), there was a slight increase in the ratio between the fluorescence intensity at the tip and the most apical nucleus, from  $1.37 \pm 0.39$  in the reference GFP::FlbB strain to  $1.65 \pm 0.25$  in the *nudA1* background ( $n=12$  and 14 hyphae, respectively;  $p=0.04$ ; Fig. 4d, bottom-left). At the restrictive temperature of 37  $^{\circ}$ C [54], we measured in the *nudA1* background an average distance between the tip and the closest nucleus of  $27.9 \pm 4.7$   $\mu$ m ( $n=23$ ; Fig. 4d, top; HhoA::mRFP was used as a marker of nuclei), clearly higher than the average distance measured by us previously in a wild-type background ( $11.0 \pm 2.8$ ;  $n=52$ ) [5]. The fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus significantly increased from  $1.18 \pm 0.42$  in the wild-type to  $3.95 \pm 1.34$  in the *nudA1* background ( $n=16$  and 33 hyphae, respectively;  $p=2.3 \times 10^{-10}$ ). These results support a model in which basipetal transport of FlbB relies principally on the motor complex dynein and its movement towards the minus ends of MTs.

### FlbD is essential for the nuclear accumulation of FlbB

FlbB has a close functional relationship with the cMyb-type UDA TF FlbD [30]. Both participate in the control of conidiation through cooperative binding to the promoter of *brlA* (*brlA<sup>P</sup>*). Furthermore, chromatin immunoprecipitation assays showed that FlbB cannot bind *brlA<sup>P</sup>* in the absence of FlbD [30]. These preliminary results suggest that FlbD plays an important role in the transcriptional activity of FlbB, but it is unknown if the cMyb factor is required for the nuclear accumulation of the bZIP. Consequently, we analyzed the localization of FlbB::GFP, driven by the native promoter, in a  $\Delta$ *flbD* strain that co-expressed the histone H1, HhoA, fused to mCherry [55], as a marker for the nuclei (Fig. 5a, left). A statistically significant inhibition of the nuclear localization of FlbB::GFP was observed in the null *flbD* strain, together with increased GFP fluorescence in the apex. The fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus increased from  $1.50 \pm 0.40$  in the wild-type to  $13.90 \pm 3.00$  in the null *flbD* strain ( $n=11$  and 13 hyphae for each strain, respectively;  $p=4.4 \times 10^{-12}$ ; see the scatter plot in Fig. 5a).

Visualizing FlbB movement in vegetative hyphae is difficult. It cannot be detected when FlbB::GFP expression is driven by the native promoter, it can be barely detected near the tip when GFP::FlbB expression is driven by the *gpdA<sup>mini</sup>* promoter [23], and can only be followed when both FlbB and FlbE are expressed constitutively (see above in Fig. 4c). Interestingly, deletion of *flbD* allowed the observation of FlbB::GFP patches (*flbB<sup>P</sup>* promoter) moving bidirectionally



◀ **Fig. 5** Domains D1 and D5 of FlbD are necessary for the nuclear accumulation of FlbB. **a** Left: micrographs and fluorescence images showing the subcellular localization of the FlbB::GFP chimera (driven by the native promoter) in vegetative hyphae of wild-type (above) and  $\Delta flbD$  strains (below). In the latter background, nuclei were marked using a HhoA::mCh chimera. Asterisks indicate tips while the arrows indicate nuclei. The graphs to the right of the images show green and red fluorescence intensity (arbitrary units) along the dotted lines. The ratios between the intensity of fluorescence at the tip and the most apical nucleus are shown below. The scatter plot to the right of the graphs shows the values of the FlbB::GFP fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured for each strain, with  $p$  values shown above. The nuclear accumulation of FlbB is significantly inhibited ( $p < 0.0001$ ; four asterisks) in the null  $flbD$  background. Middle: cytoplasmic movement of FlbB::GFP in a  $\Delta flbD$  genetic background. A representative hypha with mobile fluorescent FlbB::GFP patches is shown. The kymograph and the diagram below show the analysis of the full-time series by following the acropetal (red arrow) and basipetal (black arrows) movement of patches along the dotted line. Right: analysis of the dynamics of FlbB::GFP patches in the same strain and in a medium containing benomyl as a MT-stabilizing agent. A representative hypha is shown. Vertical lines in the kymograph and the diagram indicate an inhibition of FlbB::GFP movement as result of the addition of the drug. In all panels, scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . **b** Domain analysis of FlbD sequence. The position of each of the five predicted domains, as well as their general conservation in orthologs within Eurotiomycetes (Eurotiales and Onygenales) and Sordariomycetes, are shown. “Y” indicates conservation while “X” indicates no conservation. Yellow boxes highlight completely conserved domains. The alignment of all the orthologs of FlbD analyzed in this work can be seen in Fig. S6. The positions of the mutations within domains D1 (cMyb) and D5 (a predicted LIG\_NRBOX) characterized in panels C and D are indicated with asterisks. **c** Phenotype of wild type, null  $flbD$ , and strains expressing mutant FlbD<sup>(1–112)</sup>, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> or FlbD<sup>(L309A:L312A)</sup> forms grown on 5.5 cm plates filled with AMM after 72 h of culture. The graph on the right shows conidia production per  $\text{cm}^2$  for each strain at this time-point. Values given are the

mean of six replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of Fig. 1a). The three forms of FlbD are unable to induce the production of conidia. **d** Subcellular localization of GFP::FlbB in the  $flbD$  mutants characterized in panel c. Row 1, micrographs of representative hyphae. Row 2, green fluorescence images. Row 3, green and red fluorescence. Row 4, green fluorescence intensities (arbitrary units) along the dotted lines. Asterisks and arrowheads indicate hyphal tips and nuclei, respectively. HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm a decrease or inhibition of the nuclear accumulation of FlbB in  $flbD$  mutant backgrounds. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The scatter plot on the right shows the values of FlbB::GFP fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured in each of the  $flbD$  mutant backgrounds.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Domains D1 and D5 of FlbD are necessary for the nuclear accumulation of FlbB. **e** Phenotype of a strain expressing a GFP::FlbB chimera bearing a double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334, after 72 h of culture in 5.5 cm plates filled with AMM. GFP::FlbB and  $\Delta flbB$  strains were used as controls. The graph shows conidia production per  $\text{cm}^2$  for each strain at the same time-point. Values given are the mean of three replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Substitution of both leucine residues of FlbB causes a significant inhibition of conidia production. **f** Subcellular localization of wild-type and (L333A; L334A) GFP::FlbB chimeras in vegetative hyphae. Micrographs of representative hyphae are shown, together with green fluorescence images. HhoA::mRFP was used as a marker of nuclei in the mutant background (merge). Asterisks and the arrowhead indicate hyphal tips and a nucleus, respectively. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The graphs show red and green fluorescence intensity (arbitrary units) along the dotted lines. The scatter plot shows fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus for each strain. The double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334 of FlbB causes a significant inhibition ( $p < 0.0001$ ; four asterisks; see legend to Fig. 1a) of its nuclear accumulation. See also Fig. S5

mean of six replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of Fig. 1a). The three forms of FlbD are unable to induce the production of conidia. **d** Subcellular localization of GFP::FlbB in the  $flbD$  mutants characterized in panel c. Row 1, micrographs of representative hyphae. Row 2, green fluorescence images. Row 3, green and red fluorescence. Row 4, green fluorescence intensities (arbitrary units) along the dotted lines. Asterisks and arrowheads indicate hyphal tips and nuclei, respectively. HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm a decrease or inhibition of the nuclear accumulation of FlbB in  $flbD$  mutant backgrounds. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The scatter plot on the right shows the values of FlbB::GFP fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured in each of the  $flbD$  mutant backgrounds.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Domains D1 and D5 of FlbD are necessary for the nuclear accumulation of FlbB. **e** Phenotype of a strain expressing a GFP::FlbB chimera bearing a double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334, after 72 h of culture in 5.5 cm plates filled with AMM. GFP::FlbB and  $\Delta flbB$  strains were used as controls. The graph shows conidia production per  $\text{cm}^2$  for each strain at the same time-point. Values given are the mean of three replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Substitution of both leucine residues of FlbB causes a significant inhibition of conidia production. **f** Subcellular localization of wild-type and (L333A; L334A) GFP::FlbB chimeras in vegetative hyphae. Micrographs of representative hyphae are shown, together with green fluorescence images. HhoA::mRFP was used as a marker of nuclei in the mutant background (merge). Asterisks and the arrowhead indicate hyphal tips and a nucleus, respectively. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The graphs show red and green fluorescence intensity (arbitrary units) along the dotted lines. The scatter plot shows fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus for each strain. The double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334 of FlbB causes a significant inhibition ( $p < 0.0001$ ; four asterisks; see legend to Fig. 1a) of its nuclear accumulation. See also Fig. S5

mean of six replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with a variable number of asterisks (see legend of Fig. 1a). The three forms of FlbD are unable to induce the production of conidia. **d** Subcellular localization of GFP::FlbB in the  $flbD$  mutants characterized in panel c. Row 1, micrographs of representative hyphae. Row 2, green fluorescence images. Row 3, green and red fluorescence. Row 4, green fluorescence intensities (arbitrary units) along the dotted lines. Asterisks and arrowheads indicate hyphal tips and nuclei, respectively. HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm a decrease or inhibition of the nuclear accumulation of FlbB in  $flbD$  mutant backgrounds. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The scatter plot on the right shows the values of FlbB::GFP fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus measured in each of the  $flbD$  mutant backgrounds.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Domains D1 and D5 of FlbD are necessary for the nuclear accumulation of FlbB. **e** Phenotype of a strain expressing a GFP::FlbB chimera bearing a double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334, after 72 h of culture in 5.5 cm plates filled with AMM. GFP::FlbB and  $\Delta flbB$  strains were used as controls. The graph shows conidia production per  $\text{cm}^2$  for each strain at the same time-point. Values given are the mean of three replicates plus SD.  $p$  values are shown above and statistically significant ( $p < 0.05$ ) relations are indicated with asterisks (see legend of Fig. 1a). Substitution of both leucine residues of FlbB causes a significant inhibition of conidia production. **f** Subcellular localization of wild-type and (L333A; L334A) GFP::FlbB chimeras in vegetative hyphae. Micrographs of representative hyphae are shown, together with green fluorescence images. HhoA::mRFP was used as a marker of nuclei in the mutant background (merge). Asterisks and the arrowhead indicate hyphal tips and a nucleus, respectively. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . The graphs show red and green fluorescence intensity (arbitrary units) along the dotted lines. The scatter plot shows fluorescence intensity ratios between the tip and the most apical nucleus for each strain. The double Leu-to-Ala substitution in positions 333 and 334 of FlbB causes a significant inhibition ( $p < 0.0001$ ; four asterisks; see legend to Fig. 1a) of its nuclear accumulation. See also Fig. S5

along the cytoplasm (red and black arrows, respectively; Fig. 5a, middle). To check if the bidirectional long-distance cytoplasmic movement of FlbB::GFP in the  $\Delta flbD$  background was MT-dependent, we analyzed FlbB dynamics in a medium containing 3  $\mu\text{g/ml}$  benomyl [56]. The addition of the drug clearly inhibited FlbB::GFP movement, as shown by the vertical lines observed in the kymograph in Fig. 5a, right. These results show that in the absence of FlbD, FlbB is not accumulated in nuclei and suggests that it remains moving in both directions along the cytoplasm in a MT-dependent manner.

The above results also suggest that the quantity of FlbB that can be accumulated in nuclei is directly related to FlbD levels. If this hypothesis holds true, overexpression of  $flbD$  should correlate with a higher nuclear accumulation of the bZIP factor. Thus,  $flbD$  overexpression was induced through the  $alcA$  promoter,  $alcA^P$  [30]. According to Wieser and coworkers, overexpression of  $flbD$  triggers the development of conidiophores in shaken cultures, after the transference of mycelia from a liquid medium supplemented with glucose as the carbon source (represses  $alcA^P$ ) to a medium with threonine ( $alcA^P$  induction) [57]. This was confirmed for an  $alcA^P::flbD$  strain expressing FlbB::GFP (Fig. S5a).

EtOH (1%) and threonine (100 mM) were assessed as possible carbon sources inducing  $alcA^P$ -mediated  $flbD$  overexpression, on solid ACM medium and in comparison with the phenotypes of the reference FlbB::GFP and  $\Delta flbD$  strains (Fig. S5b). In general, all strains produced more aerial hyphae when EtOH was used as the carbon source. The use of threonine, however, induced clear phenotypic differences between  $alcA^P::flbD$  ( $1.0 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$  conidia/ $\text{cm}^2$ ) or  $alcA^P::flbD$ ; FlbB::GFP ( $1.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$  conidia/ $\text{cm}^2$ ) and the reference FlbB::GFP strain ( $5.5 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$  conidia/ $\text{cm}^2$ ;  $n = 3$  for each strain;  $p = 0.05$  and  $0.005$ , respectively).

the most apical nucleus was  $1.42 \pm 0.39$  in this case ( $n = 10$ ). This ratio increased in the same medium to  $4.51 \pm 1.92$  in the *alcA<sup>P</sup>::flbD* background ( $n = 10$ ;  $p = 5.6 \times 10^{-05}$ ), a significant change that was caused by the decrease in the nuclear localization of FlbB observed when *flbD* expression was repressed (cytoplasmic fluorescence was considered as the value of nuclear fluorescence) (Fig. S5c, upper-right panel). This localization resembled qualitatively what was observed in a  $\Delta flbD$  background (Fig. S5c, bottom-left). Under conditions inducing *alcA<sup>P</sup>*, FlbB::GFP recovered the nuclear localization (Fig. S5c, bottom-right), decreasing the fluorescence intensity ratio between the tip and the most apical nucleus to  $1.15 \pm 0.14$  ( $n = 16$ ;  $p = 3.3 \times 10^{-07}$  compared to the same strain under repressing conditions). Taken together, these results suggest that the *alcA<sup>P</sup>*-mediated upregulation of *flbD* in threonine-containing medium increases the nuclear localization of FlbB. Nevertheless, this observation cannot be directly linked to the induction of conidiophore development described in Fig. S5a (shaken cultures) because these fluorescence microscopy analyses were carried out with static instead of shaken cultures. Taken together, the results shown in this section strongly suggest that FlbD is a key element for the nuclear accumulation of FlbB.

### C- and N-termini of FlbD are necessary for conidiation

The role of FlbD in conidiation and the nuclear accumulation of FlbB was then analyzed in more detail. First, we observed that strains expressing N- or C-terminal HA<sub>3x</sub>-tagged versions of FlbD showed a delay in conidiation compared to that expressing an FlbD::GFP chimera (Fig. S5d). Conidia production in HA<sub>3x</sub>-tagged strains was significantly lower than in reference wild-type or FlbD::GFP strains after 48 h of culture in AMM plates ( $4.0\text{--}4.2 \times 10^7 \pm 0.6\text{--}1.0 \times 10^7$  conidia/cm<sup>2</sup> in reference strains;  $1.0\text{--}1.7 \times 10^7 \pm 0.2\text{--}0.3 \times 10^7$  conidia/cm<sup>2</sup> in HA<sub>3x</sub>-tagged strains;  $p = 0.65$  when the strain expressing a FlbD::GFP chimera and the wild-type strain were compared;  $p = 0.0000051$ ,  $0.00000090$  or  $0.00000024$  when strains expressing FlbD::HA<sub>3x</sub>, HA<sub>3x</sub>::FlbD or HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP chimeras were compared to the reference strain;  $n = 6$  replicates for each strain) (Fig. S5d). These results suggest that HA<sub>3x</sub> (but not GFP) tagging of FlbD partially hinders its activity.

In an attempt to explain this apparent contradiction (HA<sub>3x</sub> tag contains nine times less amino acids than GFP), the sequence of FlbD was analyzed. FlbD orthologs were found in Eurotiomycetes (Eurotiales, Onygenales) and Sordariomycetes classes, being the orthologs of this last class the most divergent ones [58]. An alignment of orthologs of Eurotiales differentiated five conserved domains but only two of them, the cMyb transcriptional regulatory domain, which is located at the N-terminus, and a small domain at

the C-terminus (residues 303–314), were conserved in all orthologs (Fig. 5b, Fig. S6). Thus, we hypothesized that tagging at either the N- or C-termini could partially inhibit FlbD function, delaying conidiation. However, the fact that HA<sub>3x</sub>-tagging but not GFP tagging, delayed conidiation was unexpected.

Since the strain expressing FlbD::GFP conidiated as the wild-type, it could be suggested that the transcript or protein chimera was unstable and therefore truncated, giving an active but untagged version of the protein. A strain expressing an HA<sub>3x</sub>::FlbD::GFP chimera was, thus, generated to confirm this hypothesis through immunodetection experiments (Fig. S5e). Two bands were detected when protein extracts of this strain were hybridized with an  $\alpha$ -HA<sub>3x</sub> antibody, one corresponding to the whole chimera and the second one at a size slightly bigger than that of HA<sub>3x</sub>::FlbD (probably including some amino acids of the N-terminus of GFP). Taken together, these results explain the low fluorescence intensity levels shown by FlbD::GFP [30] and are consistent with both the N-terminal transcriptional regulatory domain and the C-terminal domain playing an important role in FlbD activity.

The study of FlbD forms bearing specific substitutions within the N-terminal region has shown that the cMyb transcriptional regulatory domain is essential to induce or complete both asexual and sexual cycles [59], but there is no information on this region's hypothetical role in the nuclear accumulation of FlbB. Additionally, the Eukaryotic linear motif (ELM) resource for functional site prediction in proteins (<http://elm.eu.org/>) suggested that the last C-terminal amino acids of FlbD could correspond to a LIG\_NRBOX motif (amino acids 308–314; expect value:  $2.63e^{-04}$ ), which supposedly confers the ability to bind nuclear receptors and is found primarily in co-activators of those receptors ([http://elm.eu.org/elms/LIG\\_NRBOX.html](http://elm.eu.org/elms/LIG_NRBOX.html)). Considering the short length of this domain (LxxLL) and the low expect value reported, its presence in FlbD could be meaningless. Thus, we identified all *A. nidulans* proteins predictably containing a LIG\_NRBOX domain (2227 proteins) and observed that transcription factors were significantly enriched in that motif compared to proteins associated to other gene ontology terms (see Supplementary Table S3). Therefore, we judged that informatic support of the LxxLL motif of FlbD being functional justified further investigation.

Using a site-directed mutagenesis approach similar to that one followed for *flbE* mutagenesis (Fig. S1c), strains expressing a mutant FlbD<sup>(L309A:L312A)</sup> form or a truncated FlbD<sup>(1–112)</sup> form were generated. In addition, using a random mutagenesis approach, an aconidial mutant bearing two point-mutations in codons corresponding to the first and second cMyb domains of FlbD (E14G and R87Q) was isolated. The phenotype of these three mutant strains was compared to those of wild-type and null *flbD* strains (Fig. 5c). After

72 h of culture in AMM, conidia production decreased significantly in all mutants compared to the wild-type strain ( $p=0.0001$ ,  $0.0002$ , and  $0.0152$  in strains expressing FlbD<sup>(1–112)</sup>, FlbD<sup>(E14G;R87Q)</sup> or FlbD<sup>(L309A;L312A)</sup> forms, respectively;  $n=6$  for each strain). All these three mutations caused a significant increase in the ratio between the apical and nuclear fluorescence intensities of FlbB compared to the reference background, from  $1.53 \pm 0.53$  in the reference strain ( $n=17$ ) to  $6.11 \pm 2.75$ ,  $6.60 \pm 2.48$  and  $3.53 \pm 1.54$  in the three above-mentioned FlbD mutants ( $p=0.000000016$ ,  $0.0000000012$ , and  $0.000065$ , respectively;  $n=33$ ,  $31$  or  $28$  hyphae for each mutant strain; see the scatter plot in Fig. 5d; HhoA::mCherry was used as a marker of nuclei to confirm a decrease or inhibition of the nuclear accumulation of FlbB). Results suggested that besides the DNA-binding domain of FlbD (D1; cMyb), a predicted LIG\_NRBOX motif (D5) plays an important role in the nuclear accumulation of the bZIP factor FlbB.

As occurred in FlbD, the presence of a LxxLL sequence was also observed in FlbB (L330 to L334), but not in other TFs known to bind the promoter of *brlA*, such as FlbC, VosA, NsdD or AbaA. The last two Leu residues of this domain were replaced by alanines, FlbB<sup>(L333A;L334A)</sup>, causing a significant decrease in the production of conidia (Fig. 5e), from  $5.43 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7$  in the reference GFP::FlbB strain to  $0.71 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^7$  conidia/cm<sup>2</sup> in the mutant strain ( $p=0.0000192$ ;  $n=3$  for each strain). This phenotype correlated with a significant decrease in the nuclear fluorescence of FlbB. The ratio between the fluorescence intensity at the tip and the most apical nucleus increased from  $1.49 \pm 0.44$  in the reference strain to  $2.14 \pm 0.44$  in the double-leucine mutant of FlbB ( $p=0.000036$ ;  $n=14$  and  $31$  hyphae, respectively; HhoA::mRFP was used as a marker of nuclei to confirm a decrease in the nuclear accumulation of FlbB) (Fig. 5f). These results support the above-mentioned hypothesis that LxxLL motifs mediate the nuclear localization of UDA TFs FlbB and FlbD.

## Discussion

The activation of the production of asexual multicellular structures in *Aspergillus nidulans* largely (but not exclusively) relies on the signal transduction pathway controlled by FlbB, FlbE, and FlbD. A key element for the timely regulation of *brlA* expression is the spatio-temporal control in vegetative hyphae of the dynamics of FlbB, which has to be first transported to the hyphal tip and from there imported into nuclei [23]. Both FlbE and FlbD show a close functional relationship with FlbB and play key roles in this process, but clearly differentiated in space and time. The interaction with FlbE enables acropetal transport and accumulation of FlbB at the tip while FlbD is essential for the nuclear localization

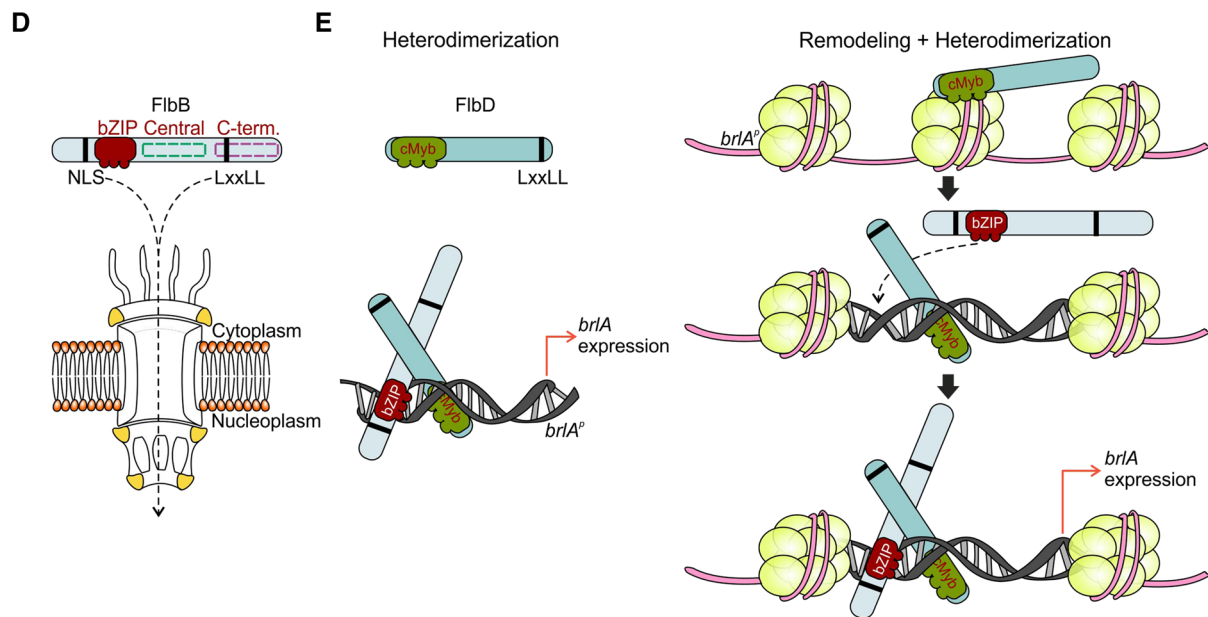
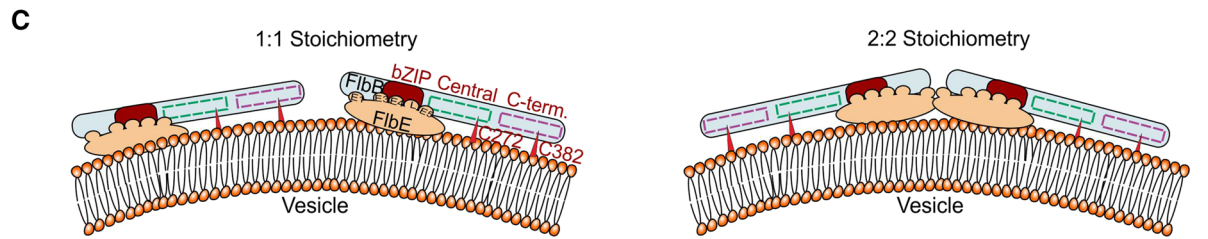
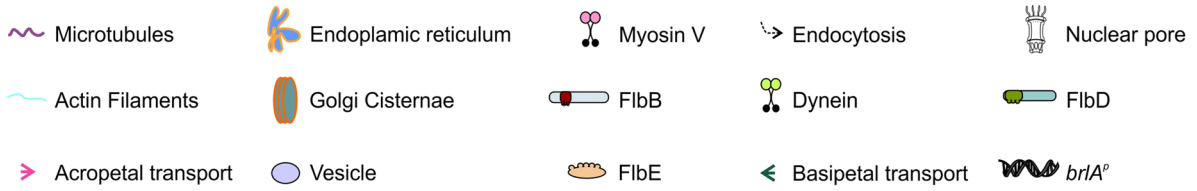
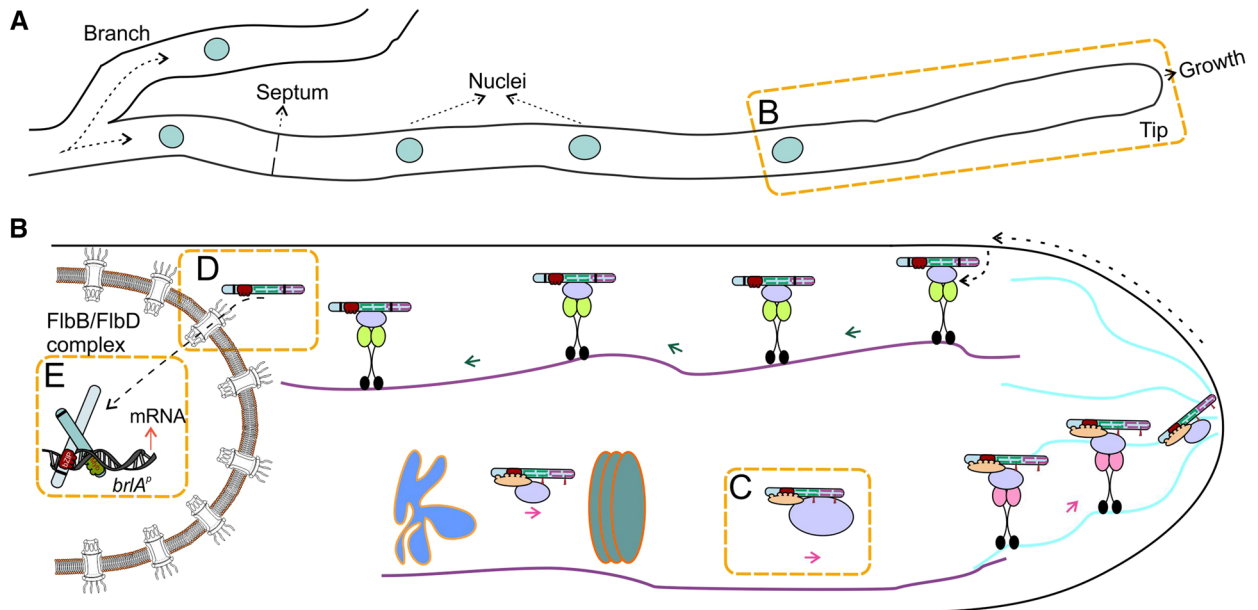
of the pool of transcriptionally active FlbB generated at the growth region. The available information and our hypotheses on the molecular basis of this sequence of events have been summarized in Fig. 6 and will be used to structure this discussion.

## Acropetal transport mechanism

The results shown in this and previous works demonstrate that the quantity of FlbB accumulated at the tip is directly related to the levels of FlbE. The nuclear, non-transcriptionally active pool of FlbB described when only FlbB is expressed constitutively decreases as the quantity of FlbE increases and disappears in those strains expressing FlbE and FlbB fused in the same chimera (*gpdA<sup>mini</sup>*-driven FlbE::FlbB::GFP or FlbE::mRFP::T2A<sup>(G17A)</sup>::FlbB::GFP). These results suggest that the FlbB/FlbE complex is composed of equimolar amounts of each developmental regulator, although the stoichiometry of the complex (i.e., 1:1 or 2:2) is still unknown (Fig. 6a–c). While the bZIP domain of FlbB is essential and sufficient for this heterodimerization and to date FlbB homodimers have not been detected [23], cysteine residues in positions 272 and 382 apparently play a modulatory role (Fig. 6c). However, that these cysteines are essential for the apical accumulation of the complex, strongly suggests that FlbB does not join its acropetal transport pathway exclusively through FlbE and that its cysteines, probably in combination with additional elements, play a key role (see the legend of Fig. 6c). Proprotein Convertase 7 is an endoprotease that shuttles between the plasma membrane and the Trans-Golgi-Network partly due to two palmitoylated cysteines [60]. Similarly, yeast chitin synthase Chs3 needs to be modified on a juxtamembranal cysteine residue to exit the endoplasmic reticulum (ER) [61, 62]. Future experiments will determine the exact role of Cys272 and Cys382 of FlbB in its transport to and accumulation at the tip.

The role of FlbE in the subcellular dynamics of FlbB seems to be limited exclusively to acropetal transport and at least five of its seven domains (E1, E4, E5, the linker domain and to lesser extent E3) [36] are necessary for the apical accumulation of the bZIP TF (Fig. 6b, c). Considering that FlbE interacts with the bZIP domain of FlbB (but apparently not with central and C-terminal domains) and the presence of a nuclear localization signal (NLS) prior to the bZIP [23], it is tempting to suggest that besides assisting the acropetal transport of the complex, FlbE binding could occlude the NLS of FlbB, precluding its basipetal transport and nuclear import.

The characteristics of FlbB transport towards the polarity site as well as the possibility of domain E1 of FlbE being a signal peptide open the possibility of the incorporation of the FlbB/FlbE complex into a vesicular fraction that would





**Fig. 6** Working model for FlbB dynamics in hyphae of *A. nidulans*. **a** Diagram showing the morphology of a hypha, including a branch, a septum (rings that separate cells within hyphae), nuclei and an actively growing tip. **b** Magnification of the region between a tip and its closest nucleus, showing a general model for the acropetal and basipetal transport of FlbB. Each player is indicated below. Dotted orange squares mark the features that are discussed in more detail in the following panels. **c** Two hypothetical configurations of the signaling complex formed by FlbB and FlbE, 1:1 (left) or 2:2 (right). In both of them, FlbB interacts with FlbE through the bZIP domain. At least five domains of FlbE (E1, E4, the linker L region, E5 and, to lower extent, E3) would participate in the interaction with the bZIP of FlbB (see also [36]). At least domain E1 would link the complex to the corresponding transport pathway, maybe a vesicle attached to a still unknown molecular motor. Cys382 [23] and Cys272 of FlbB are required for the acropetal transport of the FlbB/FlbE complex but not for their interaction. They could mediate an interaction with a transport vesicle and/or be required to acquire a specific three-dimensional conformation essential to join the transport pathway (this last option is not considered in the model). Finally, myosin V, MyoE, would transport the complex from the subapex to the growing apex of the tip. **d** At the hyphal subapex, FlbB would join a dynein-mediated basipetal transport pathway (probably attached to a vesicle or an early-endosome) that would approximate the TF to the nucleus. A NLS and a LxxLL motif would be required for the import of FlbB across nuclear pores and its accumulation in nuclei (see also [23]), as well as the cMyb domain and an additional LxxLL motif of FlbD (see panel e). **e** Both FlbB and FlbD bind a common region of 300 bp within the promoter of *brlA*, *brlA<sup>P</sup>* [30]. Based on previous publications describing the interaction of cMyb and bZIP proteins for the control of gene expression [67], a heterodimerization model is proposed on the left. Considering the essentiality of FlbD for the nuclear accumulation of FlbB, as well as the similarities between cMyb (transcriptional regulation) and SANT (chromatin remodeling) domains ([http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/protein/proteinPage.pl?dbid=ASPL0000052812&seq\\_source=A.%20nidulans%20FGSC%20A4](http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/protein/proteinPage.pl?dbid=ASPL0000052812&seq_source=A.%20nidulans%20FGSC%20A4)), a more speculative “Remodeling + Heterodimerization” model is proposed. In this model, FlbD binds *brlA<sup>P</sup>* first, inducing, maybe in combination with other proteins such as GcnE or LaeA [68, 69], a chromatin remodeling event that enables heterodimerization with FlbB and binding of both TFs to their targets at *brlA<sup>P</sup>*. The NLS of FlbB improves DNA binding [37] and the LxxLL motifs of both FlbD and FlbB may play a modulatory role

transit through the ER-Golgi network (Fig. 6b). In preliminary LC-MS/MS-coupled pull-down assays of protein extracts of a strain expressing the *gpdA<sup>mini</sup>*-driven GFP::FlbB chimera, we identified several proteins participating in the transport between the ER and the Golgi apparatus. These preliminary results correlate with the hypothesis proposed above and at the same time open an avenue for a future, comprehensive analysis of how these two developmental regulators join the secretory pathway, which additional proteins they establish interactions with, which of their domains are required or what could be the conformation and stoichiometry of the complex. The transit of vesicles between the ER and the Golgi apparatus is MT dependent, while FlbB reaches the apex of hyphae in a culture medium containing benomyl, which destabilizes MTs [23]. Thus, additional experiments are required to elucidate the hypothetical mechanism of FlbB/FlbE transition through the ER-Golgi network.

In the absence of actin polymerization, FlbB reaches the subapex but fails to accumulate in the apex [23]. In a null *myoE* background, FlbB spreads into an apical crescent that resembles the localization shown in that genetic background by the post Golgi-carrier marker RabE/Rab11 [52, 54]. As Pantazopoulou and collaborators found in their characterization of RabE, it could be suggested that, without MyoE activity, FlbB might be captured by the “actin mop” but lacked a molecular motor which could deliver it to the apex [52]. Thus, myosin V (MyoE) arises as the best candidate motor protein to deliver FlbB, on actin filaments, from the subapex to the apex (Fig. 6b).

### Basipetal transport and nuclear accumulation of FlbB

The results shown here suggest that FlbB departs from the dynein-loading region in its journey towards nuclei (Fig. 6b). In accordance with the long-distance basipetal transport of vesicles and macromolecular cargo in neurons, it is generally accepted in *A. nidulans* hyphae that vesicles formed by endocytosis at the subapex are bound by the dynein complex and transported on MTs towards distal regions [63]. The inhibition of the nuclear accumulation of FlbB observed in a thermo-sensitive heavy-chain dynein *nudA1* background at the restrictive temperature (37 °C) correlates with a model in which FlbB follows this pathway. This, at the same time, is in agreement with the MT-dependence of the cytoplasmic, bidirectional transport of FlbB observed in a  $\Delta flbD$  background, which suggests that in the absence of FlbD, a fraction of FlbB remains moving bidirectionally along the length of the cytoplasm. An interesting question for the future will be the elucidation of how FlbB joins the dynein-mediated basipetal transport pathway and the identification of adaptor proteins and the karyopherins required for its nuclear accumulation. This will open the possibility of a deeper analysis of the role of the NLS and the LxxLL motif of FlbB, both of them required for the nuclear accumulation of the TF (Fig. 6b, d).

In the absence of FlbD, FlbB does not accumulate in nuclei and cannot bind *brlA<sup>P</sup>* [30], thus inhibiting conidiation. Besides offering the possibility of using the null *flbD* strain to identify proteins required for the basipetal transport and nuclear accumulation of FlbB, these results raise the following question: which is the primary cause of the inability to trigger asexual development in this background. It is clear that the absence of FlbB from nuclei impedes binding to *brlA<sup>P</sup>* but, at the same time, FlbB accumulation in nuclei may be reduced due to an inability to bind DNA in the absence of FlbD activity (Fig. 6b, e). The only subcellular localization described for FlbD and the orthologs that have been functionally characterized is nuclear [30, 64, 65], suggesting that it is not directly involved in the basipetal transport of

FlbB but in its nuclear retention. Our results show that both the N- and C-termini of FlbD are necessary for the induction of conidiation and the nuclear accumulation of FlbB. Since its N-terminal cMyb transcriptional regulatory domain is sufficient for FlbD to bind *brlA<sup>P</sup>* [30], a link between DNA-binding by FlbD and the nuclear accumulation of FlbB (and perhaps DNA-binding by the bZIP TF) can be suggested. In this context, the possibility of FlbD acting as a pioneer TF is open [66], binding *brlA<sup>P</sup>* first [30], causing a modification of the conformation of chromatin and enabling then binding of FlbB (Fig. 6e) [66, 67]. Alternatively (or in addition), the cMyb domain of FlbD could act as a heterodimerization domain for the bZIP of FlbB [67], forming a heterocomplex which, in turn, is capable of binding to the targets of each TF within *brlA<sup>P</sup>*, which are predicted to be adjacent (Fig. 6e) [30]. In both scenarios, LxxLL motifs of both FlbD and FlbB may play a modulatory role and/or mediate in the interaction with additional elements. Although both TFs bind to a common region of 300 nt-s within *brlA<sup>P</sup>*, future experiments must determine the nature of the exact target-DNA sequences of both FlbB and FlbD in *brlA<sup>P</sup>*, the hierarchy/democracy between both TFs and the study of hypothetical modifications in the structure of chromatin at this region [68, 69]. The extension of these analyses to other activators and repressors that bind *brlA<sup>P</sup>* (Lee et al., 2016) will further a deeper understanding of how TFs belonging to different pathways are coordinated for a timely control of multicellular development.

**Acknowledgements** We want to acknowledge the work done by Ion Luis Abad, Luis Pablo Gonzalo and Alba Ledesma, all of them former students at UPV/EHU, in the generation of point *flbE* mutants (W11A) and the strains expressing the T2A-tagged forms, as well as the bioinformatic analysis of FlbD.

**Author contribution** OE, EAE, AO, EPA and EOA designed and generated the strains, and carried out the experiments. OE and EAE supervised the experimental part. OE wrote the manuscript. MSC performed bioinformatic analyses. All authors contributed to the improvement of the text and figures.

**Funding** Work at the UPV/EHU lab was funded by UPV/EHU (Grant EHUA15/08 to O.E) and the Basque Government (Grant IT599-13 to Dr. Unai Ugalde). Work at CIB.CSIC was funded by MINECO (BFU2015-66806-R) and MICIU (RTI2018-094263-B-100) to E.A.E (both partially supported by FEDER, EU). E.P-A and E.O-A held predoctoral fellowships from UPV/EHU. A.O held a predoctoral fellowship from the Basque Government.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** No conflict of interest declared.

## References

- Bradshaw RA, Dennis EA (2010) Cell signaling: yesterday, today, and tomorrow. In: Bradshaw RA, Second E (eds) Dennis EABT-H of CS. Academic Press, San Diego, pp 1–4
- Rishal I, Kam N, Perry RB-T et al (2012) A motor-driven mechanism for cell-length sensing. *Cell Rep* 1:608–616. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.013>
- Bielska E, Higuchi Y, Schuster M et al (2014) Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* 6:5097. <https://doi.org/10.1038/ncomms6097>
- Ramos-García SL, Roberson RW, Freitag M et al (2009) Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 8:1880 LP-1890. <https://doi.org/10.1128/EC.00062-09>
- Etxebeste O, Espeso EA (2016) Neurons show the path: tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw021>
- Panayotis N, Karpova A, Kreutz MR, Fainzilber M (2015) Macromolecular transport in synapse to nucleus communication. *Trends Neurosci* 38:108–116. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.001>
- Terenzio M, Koley S, Samra N et al (2018) Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* (80-) 359:1416 LP-1421. <https://doi.org/10.1126/science.aan1053>
- Ben-Yaakov K, Dagan SY, Segal-Ruder Y et al (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* 31:1350–1363. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.494>
- Takeshita N, Evangelinos M, Zhou L et al (2017) Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc Natl Acad Sci* 114:5701–5706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700204114>
- Riquelme M (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* 67:587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>
- Riquelme M, Aguirre J, Bartnicki-García S et al (2018) Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol Rev* 82(2). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-17>
- Turrà D, Di Pietro A (2015) Chemotropic sensing in fungus–plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* 26:135–140. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.004>
- Turrà D, El Ghalid M, Rossi F, Di Pietro A (2015) Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature* 527:521–524
- Masachis S, Segorbe D, Turrà D et al (2016) A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. *Nat Microbiol* 1:16043
- Stephenson KS, Gow NAR, Davidson FA, Gadd GM (2014) Regulation of vectorial supply of vesicles to the hyphal tip determines thigmotropism in *Neurospora crassa*. *Fungal Biol* 118:287–294. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.007>
- Brand AC, Morrison E, Milne S et al (2014) Cdc42 GTPase dynamics control directional growth responses. *Proc Natl Acad Sci* 111:811 LP-816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307264111>
- Brand A, Gow NAR (2012) Tropic orientation responses of pathogenic fungi. In: Pérez-Martín J, Di Pietro A (eds) *Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Topics in current genetics*, vol 22. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22916-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22916-9_2)
- Mooney JL, Yager LN (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4:1473–1482. <https://doi.org/10.1101/gad.4.9.1473>

19. Skromne I, Sanchez O, Aguirre J (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21–28. <https://doi.org/10.1099/00221287-141-1-21>
20. Adams TH, Wieser JK, Yu J-H (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:35–54
21. Rodríguez-Urra AB, Jiménez C, Nieto MI et al (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* 7:599–606. <https://doi.org/10.1021/cb200455u>
22. Ugalde U, Rodríguez-Urra AB (2014) The Mycelium Blueprint: insights into the cues that shape the filamentous fungal colony. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8809–8819. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6019-6>
23. Herrero-García E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Cortese MS et al (2015) Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol Microbiol* 98:607–624. <https://doi.org/10.1111/mmi.13156>
24. Etxebeste O, Villarino M, Markina-Iñarrairaegui A et al (2013) Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells. *PLoS One* 8:e85076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085076>
25. Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL et al (2012) The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet* 8:e1002816. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002816>
26. Hernández-Ortiz P, Espeso EA (2017) Spatiotemporal dynamics of the calcineurin target CrzA. *Cell Signal* 29:168–180. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.11.005>
27. Meyer V, Andersen MR, Brakhage AA et al (2016) Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol* 3:6. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0024-8>
28. Lee M-K, Kwon N-J, Lee I-S et al (2016) Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep* 6:28874. <https://doi.org/10.1038/srep28874>
29. Oiartzabal-Arano E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Espeso EA, Etxebeste O (2016) Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 62:371–377. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0556-0>
30. Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E et al (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
31. Kwon N-J, Garzia A, Espeso EA et al (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 77:1203–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07282.x>
32. Etxebeste O, Ni M, Garzia A et al (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7:38–48
33. Cove DJ (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta Enzymol Biol Oxid* 113:51–56. [https://doi.org/10.1016/S0926-6593\(66\)80120-0](https://doi.org/10.1016/S0926-6593(66)80120-0)
34. Käfer E (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:217 LP-232
35. Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, Peñalva MÁ (2012) An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* 125:1784–1795. <https://doi.org/10.1242/jcs.098897>
36. Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E et al (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* 71:172–184
37. Etxebeste O, Herrero-García E, Araújo-Bazán L et al (2009) The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 73:775–789
38. Peñalva MA (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* 42:963–975. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.09.004>
39. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG et al (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26:205–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)
40. Yang L, Ukil L, Osmani A 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. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004>
41. Szweczyk E, Nayak T, Oakley CE et al (2007) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* 1:3111–3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
42. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2:811–821. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>
43. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.006>
44. Hervás-Aguilar A, Peñalva MA (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. <https://doi.org/10.1128/EC.00119-10>
45. Fernández-Martínez J, Brown CV, Díez E et al (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the Zinc Finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334:667–684. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.072>
46. Pantazopoulou A, Peñalva MA (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* 20:4335–4347. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-03-0254>
47. Cortese MS, Etxebeste O, Garzia A et al (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* 6:e17505
48. Chu X-L, Feng M-G, 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. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0517-7>
49. Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC et al (2018) InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res* 1:1. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
50. Arribere JA, Cenik ES, Jain N et al (2016) Translation readthrough mitigation. *Nature* 534:719–723. <https://doi.org/10.1038/nature18308>
51. Taheri-Talesh N, Xiong Y, Oakley BR et al (2012) The functions of Myosin II and Myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 7:e31218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031218>
52. Pantazopoulou A, Pinar M, Xiang X, Peñalva MA (2014) Maturation of late Golgi cisternae into RabE(RAB11) exocytic post-Golgi carriers visualized *in vivo*. *Mol Biol Cell* 25:2428–2443. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0710>
53. Xiang X, Beckwith SM, Morris NR (1994) Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci* 91:2100–2104

54. Peñalva MA, Zhang J, Xiang X, 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* 28:947–961
55. Markina-Iñarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-García E et al (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 22:3874–3886. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0262>
56. Abenza JF, Pantazopoulou A, Rodríguez JM et al (2009) Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 10:57–75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00848.x>
57. Wieser J, Adams TH (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* 9:491–502. <https://doi.org/10.1101/GAD.9.4.491>
58. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV et al (2017) The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol Spectr*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>
59. Arratia-Quijada J, Sánchez 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. <https://doi.org/10.1128/EC.00101-12>
60. Declercq J, Ramos-Molina B, Sannerud R et al (2017) Endosome to trans-Golgi network transport of proprotein convertase 7 is mediated by a cluster of basic amino acids and palmitoylated cysteines. *Eur J Cell Biol* 96:432–439. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.03.010>
61. Lam KKY, Davey M, Sun B et al (2006) Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol* 174:19 LP-25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602049>
62. Geva Y, Schuldiner M (2014) The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 24:R130–R136. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.008>
63. Xiang X, Qiu R, Yao X et al (2015) Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cell Mol Life Sci* 72:3267–3280. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1926-y>
64. Son H, Kim M-G, Chae S-K, Lee Y-W (2014) FgFlbD regulates hyphal differentiation required for sexual and asexual reproduction in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *J Microbiol* 52:930–939. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4384-6>
65. Matheis S, Yemelin A, Scheps D et al (2017) Functions of the *Magnaporthe oryzae* Flb3p and Flb4p transcription factors in the regulation of conidiation. *Microbiol Res* 196:106–117. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.010>
66. Soufi A, Garcia MF, Jaroszewicz A et al (2015) Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* 161:555–568. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.017>
67. Tahirov TH, Sato K, Ichikawa-Iwata E et al (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* 108:57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00636-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00636-5)
68. Cánovas D, Marcos AT, Gacek A et al (2014) The histone acetyltransferase GcnE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development. *Genetics* 197:1175–1189. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165688>
69. Lind AL, Lim FY, Soukup AA et al (2018) An LaeA- and BrlA-dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* 3:e00050-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00050-18>
70. De Souza CPC, Osmani AH, Hashmi SB, Osmani SA (2004) Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 14:1973–1984. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.050>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## Rewiring of transcriptional networks as a major event leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi

Oier Etxebeste, Ainara Otamendi, Aitor Garzia, Eduardo A. Espeso & Marc S. Cortese

To cite this article: Oier Etxebeste, Ainara Otamendi, Aitor Garzia, Eduardo A. Espeso & Marc S. Cortese (2019) Rewiring of transcriptional networks as a major event leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi, *Critical Reviews in Microbiology*, 45:5-6, 548-563, DOI: [10.1080/1040841X.2019.1630359](https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1630359)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1630359>



[View supplementary material](#)



Published online: 03 Jul 2019.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 128



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 1 [View citing articles](#)

## Rewiring of transcriptional networks as a major event leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi

Oier Etxebeste<sup>a</sup> , Ainara Otamendi<sup>a</sup>, Aitor Garzia<sup>b</sup>, Eduardo A. Espeso<sup>c</sup>  and Marc S. Cortese<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Laboratory of Biology, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country (UPV/EHU), San Sebastian, Spain; <sup>b</sup>Howard Hughes Medical Institute and Laboratory for RNA Molecular Biology, The Rockefeller University, New York, NY, USA; <sup>c</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

### ABSTRACT

Complex multicellularity (CM) is characterized by the generation of three-dimensional structures that follow a genetically controlled program. CM emerged at least five times in evolution, one of them in fungi. There are two types of CM programs in fungi, leading, respectively, to the formation of sexual or asexual spores. Asexual spores foment the spread of mycoses, as they are the main vehicle for dispersion. In spite of this key dependence, there is great morphological diversity of asexual multicellular structures in fungi. To advance the understanding of the mechanisms that control initiation and progression of asexual CM and how they can lead to such a remarkable morphological diversification, we studied 503 fungal proteomes, representing all phyla and subphyla, and most known classes. Conservation analyses of 33 regulators of asexual development suggest stepwise emergence of transcription factors. While velvet proteins constitute one of the most ancient systems, the central regulator BrIA emerged late in evolution (with the class Eurotiomycetes). Some factors, such as MoConX4, seem to be species-specific. These observations suggest that the emergence and evolution of transcriptional regulators rewire transcriptional networks. This process could reach the species level, resulting in a vast diversity of morphologies.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 August 2018  
Revised 4 April 2019  
Accepted 6 June 2019  
Published online 28 June 2019

### KEYWORDS

Fungi; asexual development; complex multicellularity; asexual spore; transcriptional network



### Introduction: the importance of asexual development in the fungal life-cycle


According to recent estimates, the fungal kingdom comprises between 2.2 and 3.8 million species, being one of the most diverse clades of eukaryotes (Hawksworth and Lücking 2017). Fungal species have adapted to multiple niches and have developed characteristic cell shapes and morphogenetic/developmental patterns, from single celled yeasts to filamentous multicellular species with a polar mode of cell-growth, or from dimorphic species to flagellated fungi.

Many of these species have been domesticated with some used traditionally for the preservation and/or transformation of foods while others have been optimized to yield valuable biotechnological products (see references within (Johnson 2016; Meyer et al. 2016)). Fungi have also established both symbiotic and antagonistic associations with humans, animals and plants (Hawksworth and Lücking 2017). Over 8000 fungal plant pathogens are known (Editorial Nature

Microbiology 2017) and estimates suggest that fungi (and oomycetes) have an annual impact on major crop yields equivalent to the caloric needs of more than 500 million people (Fisher et al. 2012). Additionally, around 300 fungal human pathogens are known, killing more than 1.5 million people annually. Fungal infections are among the most-rapidly spreading pests (Bebber et al. 2014). This problem is compounded by the simultaneous emergence of the same pathogenic strain in different continents or local episodes of strains from distant locations (Islam et al. 2016; Malaker et al. 2016; Callaway 2016; Lockhart et al. 2017; Bhattacharya 2017).

If a pathogen needs its hosts in order to thrive, theory predicts that the requirement of a minimum host population would cause the pathogen go extinct before the host itself; thus, infection should not be considered a vector that drives extinction (McCallum and Dobson 1995; de Castro and Bolker 2005). Nevertheless, the theoretical models developed by Fisher and colleagues support the idea that fungi pose a greater threat to plant and animal biodiversity than other

**CONTACT** Oier Etxebeste  [oier.echeveste@ehu.eus](mailto:oier.echeveste@ehu.eus)  Laboratory of Biology, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country, Manuel de Lardizabal, 3, San Sebastian 20018, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

taxonomic classes of pathogens (Fisher et al. 2012). The authors suggest that this is attributable to some of the biological features of the life-cycle of fungi, such as long-lived environmental stages, broad host ranges in the case of generalist pathogens as well as high virulence and mortality rates. Asexual spores are tightly linked to these traits and this is likely why these propagules have prevailed in evolution as the main vector for the spread of mycoses. Their mass production leads to rapid inter-host transmission rates, which can result in the infection of all individuals before the population is driven to the low densities at which the pathogen can no longer spread (Fisher et al. 2012). Considering the relevance of asexual spores for dispersion and infection, it is important to study how the associated developmental programs have evolved in fungi.

Asexual spores are the last cell-type of a series of genetically programmed morphological transitions leading to the formation, in multiple cases, of complex multicellular structures (see references within (Nagy et al. 2018)). Nevertheless, the morphological diversity of asexual structures generated by the millions of fungal species is vast (Kirk et al. 2008). Fungal asexual spores are produced by four different mechanisms (see references within (Fischer and Kües 2006)): (1) fragmentation of pre-existing hyphal filaments to generate arthrospores or oidia; (2) protoplast contraction and formation of an inner, thickened secondary cell wall within pre-existing vegetative hyphal cells to form chlamydospores; (3) cytoplasmic cleavage within specialized spore mother cells, generating a sporangium and sporangiospores; and (4) localized budding and subsequent constriction from an external sporogenous cell to develop conidiospores or conidia. Furthermore, even if two species develop the same type of asexual spore, they will most probably differ in size, organelle composition and/or morphology. This morphological diversity occurs even among evolutionarily close fungal species, suggesting that fungal asexual development can be considered an example of evolutionary convergence, that is, the generation of structures with different morphologies but with a common function: in this case, the production of spores enabling dispersal to new environments.

With the aim of uncovering the key mechanisms controlling the initiation and progression of asexual multicellularity and hypothesizing how they could contribute to the above-mentioned morphological diversity, we built a database containing the proteomes of 503 fungal species. In parallel, and based on previously published data, we generated a list of 33 proteins known to play key roles in the induction of asexual

development, the control of its progression or the balance between asexual and sexual spore production. The conservation of each of these protein sequences was determined for each species in the database, and results were systematically analyzed from an evolutionary perspective. Overall, we propose that emergence of transcription factors (TFs) and network rewiring are major events leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi. Results also suggest that asexual development can serve as a model for studying the emergence of complex multicellularity (CM) and the mechanisms controlling it.

### Database generation

The steadily increasing number of sequenced fungal genomes available enables increasingly more informative systematic sequence conservation analyses. These sequencing projects have been generated as a result of individual or collective efforts (Stajich 2017) and have been aggregated and updated in publicly available servers. In this study, the proteomes of 503 fungal species were downloaded from the Ensembl Fungi database (<https://fungi.ensembl.org/index.html>; release 37; release date, 02/11/2017). These species represented all fungal phyla/subphyla and most classes. The exceptions were neocallimastigomycetes (chytridiomycota); zoopagomycotina and kickxellomycotina (zoopagomycota); coniocybomycetes, lichinomycetes, geoglossomycetes, arthoniomycetes and laboulbeniomycetes (pezizomycotina); archaeorhizomycetes (taphrinomycotina); cryptomycocolacomycetes, cystobasidiomycetes, agaricostilbomycetes, atractiellomycetes, classiculomycetes and tritirachiomycetes (pucciniomycotina); and entorrhizomycetes, and moniliellomycetes (ustilaginomycotina). This meant that, although not in equal number, 65% of the classes included in the tree by Spatafora and colleagues were represented at least by one species in our database (Spatafora et al. 2017). The database contained the proteomes of 344 ascomycota, 114 basidiomycota and 45 early diverging fungal species (1 blastocladiomycota, 4 chytridiomycota, 1 cryptomycota, 24 microsporidia, 14 mucoromycota and 1 zoopagomycota species) (see Table 1). The number of species within each phylum, subphylum, class and order is shown in Table 1 (a Supplementary Table including the taxonomy of each species of the database, together with the accession number of each proteome, its source, and the first letters of the accession codes used to identify each protein within each proteome is available online).

**Table 1.** Number of database species (in brackets) in each phylum, subphylum, class and order (503 species).

| Phylum                 | Subphylum               | Class                     | Order                       |                        |
|------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Ascomycota (344)       | Pezizomycotina (256)    | Dothideomycetes (36)      | Botryosphaerales (4)        |                        |
|                        |                         |                           | Capnodiales (9)             |                        |
|                        |                         |                           | Dothideales (4)             |                        |
|                        |                         |                           | Incertae ordinis (2)        |                        |
|                        |                         |                           | Pleosporales (16)           |                        |
|                        |                         |                           | Venturiales (1)             |                        |
|                        |                         |                           | Eurotiomycetes (107)        | Chaetothyriales (23)   |
|                        |                         |                           |                             | Eurotiales (58)        |
|                        |                         |                           |                             | Onygenales (24)        |
|                        |                         |                           |                             | Phaeomoniellales (1)   |
|                        |                         | Verrucariales (1)         |                             |                        |
|                        |                         | Umbilicariales (1)        |                             |                        |
|                        |                         | Lecanoromycetes (1)       | Umbilicariales (1)          |                        |
|                        |                         |                           | Leotiomycetes (16)          |                        |
|                        |                         |                           |                             | Erysiphales (2)        |
|                        |                         |                           |                             | Helotiales (10)        |
|                        |                         |                           |                             | Incerti ordinis (4)    |
|                        |                         |                           |                             | Orbiliomycetes (3)     |
|                        |                         |                           |                             | Orbiliales (3)         |
|                        |                         |                           |                             | Pezizales (2)          |
|                        |                         | Sordariomycetes (90)      |                             |                        |
|                        |                         | Coniochaetales (1)        |                             |                        |
|                        |                         | Diaporthales (3)          |                             |                        |
|                        |                         | Glomerellales (16)        |                             |                        |
|                        |                         | Hypocreales (46)          |                             |                        |
|                        |                         | Magnaporthales (3)        |                             |                        |
|                        |                         | Microascales (3)          |                             |                        |
|                        |                         | Ophistomatales (5)        |                             |                        |
|                        |                         | Sordariales (9)           |                             |                        |
|                        |                         | Togniniales (1)           |                             |                        |
|                        |                         | Xylariales (3)            |                             |                        |
|                        |                         | Xylonomycetales (1)       |                             |                        |
|                        | Saccharomycotina (79)   | Saccharomycetes (79)      | Saccharomycetales (79)      |                        |
|                        | Taphrinomycotina (9)    | Neoelectomycetes (1)      | Neoelectales (1)            |                        |
|                        |                         | Pneumocystidomycetes (3)  | Pneumocystidales (3)        |                        |
|                        |                         | Schizosaccharomycetes (4) | Schizosaccharomycetales (4) |                        |
|                        |                         | Taphrinomycetes (1)       | Incerti ordinis (1)         |                        |
| Basidiomycota (114)    | Pucciniomycotina (11)   | Microbotryomycetes (5)    | Microbotryales (5)          |                        |
|                        |                         | Mixiomycetes (1)          | Mixiales (1)                |                        |
|                        |                         | Pucciniomycetes (5)       | Pucciniales (5)             |                        |
|                        |                         | Ustilaginomycetes (6)     | Ceraceosorales (1)          |                        |
|                        | Ustilaginomycotina (18) | Agaricomycotina (85)      | Exobasidiomycetes (6)       | Tilletiales (4)        |
|                        |                         |                           |                             | Georgefischeriales (1) |
|                        |                         |                           |                             | Malasseziales (2)      |
|                        |                         |                           |                             | Ustilaginomycetes (10) |
|                        |                         |                           |                             | Agaricomycetes (66)    |
|                        |                         |                           |                             | Agaricales (19)        |
|                        |                         |                           |                             | Amylocorticiales (1)   |
|                        |                         |                           |                             | Atheliales (2)         |
|                        |                         |                           |                             | Auriculariales (1)     |
|                        |                         |                           |                             | Boletales (11)         |
|                        | Cantharellales (4)      |                           |                             |                        |
|                        | Corticiales (1)         |                           |                             |                        |
|                        | Geastrales (1)          |                           |                             |                        |
|                        | Gloeophyllales (2)      |                           |                             |                        |
|                        | Hymenochaetales (2)     |                           |                             |                        |
|                        | Jaapiales (1)           |                           |                             |                        |
|                        | Polyporales (14)        |                           |                             |                        |
|                        | Russulales (3)          |                           |                             |                        |
|                        | Sebacinales (2)         |                           |                             |                        |
|                        | Trechisporales (2)      |                           |                             |                        |
|                        | Dacrymycetes (3)        |                           |                             |                        |
|                        | Tremellomycetes (14)    |                           |                             |                        |
|                        |                         | Dacrymycetales (3)        |                             |                        |
|                        |                         | Cystofilobasidiales (1)   |                             |                        |
|                        |                         | Tremellales (11)          |                             |                        |
|                        |                         | Thichosporonales (2)      |                             |                        |
|                        |                         | Wallemiales (2)           |                             |                        |
| Blastocladiomycota (1) |                         | Blastocladiomycetes (1)   | Blastocladiiales (1)        |                        |
| Chytridiomycota (4)    |                         | Chytridiomycetes (3)      | Rhizophydiales (2)          |                        |
|                        |                         |                           | Spizellomycetales (1)       |                        |
|                        |                         | Monoblepharidomycetes (1) | Monoblepharidales (1)       |                        |
|                        |                         |                           | Incertae sedis (1)          |                        |
| Cryptomycota (1)       |                         |                           |                             |                        |
| Microsporidia (24)     |                         |                           |                             |                        |
| Mucoromycota (14)      |                         | Glomeromycetes (1)        | Glomerales (1)              |                        |
|                        |                         | Mortierellomycetes (2)    | Mortierellales (2)          |                        |
|                        |                         | Mucoromycetes (11)        | Mucorales (11)              |                        |
|                        |                         | Entomophthoromycetes (1)  | Entomophthorales (1)        |                        |
| Zoopagomycota (1)      |                         |                           |                             |                        |

A [Supplementary table](#) including the taxonomy of each database species, the source of the corresponding proteome and its accession number is available online.



## Genetic control of asexual multicellularity: induction, morphological transitions and coordination with the sexual cycle

The literature was reviewed in order to generate a list of regulators of fungal asexual development (Table 2). An enrichment of TFs was noted (28 out of 33; 85%). These proteins were classified into different groups, according to the role described in the literature (listed in Table 2; displayed in a graphical mode for *Aspergillus nidulans* regulators in Figure 1). First, proteins controlling the balance between sexual and asexual developmental cycles (coded with pink in figures). Second, inducers of asexual development (orange). Third, regulators controlling, in space and time, the progression of the morphological transitions leading to asexual spore production (green). Finally, those proteins that could not be included in any of the first three groups (yellow). Most of the regulators were originally characterized in *A. nidulans* (eurotiomycetes), which undoubtedly is the most widely used reference organism in the study of asexual CM (Meyer et al. 2016). However, and due to seminal (in the case of *Neurospora crassa*) or more recent (in the case of *Botrytis cinerea* and *Magnaporthe*

*oryzae*) characterization of additional regulators from other species (Selitrennikoff et al. 1974; Cao et al. 2016; Brandhoff et al. 2017), organisms of different fungal clades (Leotiomycetes and Sordariomycetes) have also been included as reference.

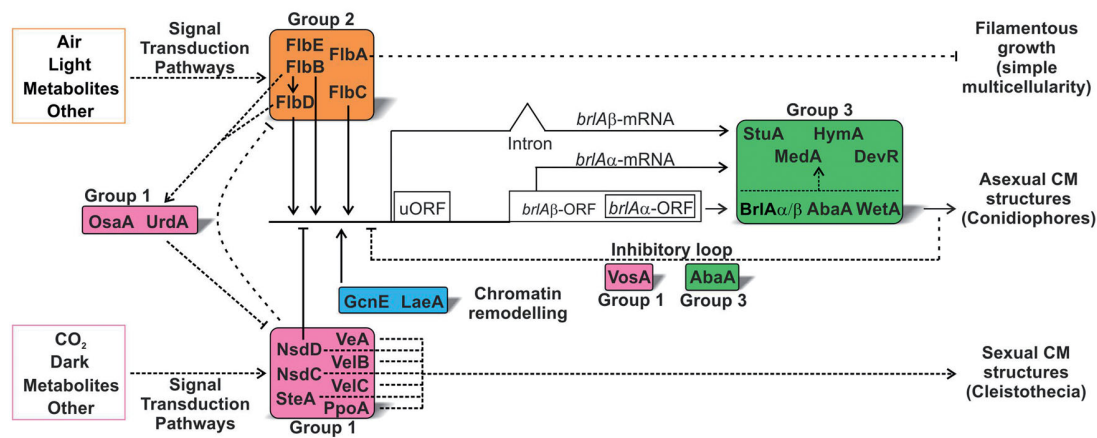
### Group 1: Regulators of the balance between sexual and asexual development

Ten proteins were included in this first group (all characterized in *A. nidulans*; pink colour in Figure 1; Table 2). Nine were TFs (VeA, VelB, VelC, VosA, NsdC, NsdD, OsaA, UrdA and SteA). The only non-TF in this group, PpoA, is one of the psi factor-producing oxygenases that control the ratio of sexual to asexual spores (Tsitsigiannis et al. 2004). Among the TFs, VeA, VelB and VelC, together with VosA, belong to the velvet family of transcriptional regulators and are key players in the transduction of light signals as well as the coordination of developmental pathways and secondary metabolism (Ni and Yu 2007; Bayram et al. 2010; Rodriguez-Romero et al. 2010; Ahmed et al. 2013). VeA participates in the transduction of red and blue light signals (Mooney and Yager 1990; Purschwitz et al. 2008) by rapidly varying,

**Table 2.** Regulators of asexual development used as query.

| Regulator | Reference organism          | Group of regulators | Reference                                   |
|-----------|-----------------------------|---------------------|---|
| NsdC      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Kim et al. 2009)                           |
| NsdD      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Lee et al. 2014; Lee et al. 2016)          |
| OsaA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Alkahyyat et al. 2015)                     |
| PpoA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Tsitsigiannis et al. 2004)                 |
| SteA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Vallim et al. 2000)                        |
| UrdA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Oizartabal-Arano et al. 2015)              |
| VeA       | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Mooney and Yager 1990)                     |
| VelB      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Bayram et al. 2008)                        |
| VelC      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Park et al. 2014)                          |
| VosA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 1                   | (Ni and Yu 2007)                            |
| BcLTF2    | <i>Botrytis cinerea</i>     | 2                   | (Brandhoff et al. 2017)                     |
| BcLTF3    | <i>Botrytis cinerea</i>     | 2                   | (Brandhoff et al. 2017)                     |
| BcLTF7    | <i>Botrytis cinerea</i>     | 2                   | (Brandhoff et al. 2017)                     |
| F1bA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Lee and Adams 1994; Wieser et al. 1994)    |
| F1bB      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Wieser et al. 1994; Etxebeste et al. 2008) |
| F1bC      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Wieser et al. 1994; Kwon et al. 2010)      |
| F1bD      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Wieser et al. 1994; Garzia et al. 2010)    |
| F1bE      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Wieser et al. 1994; Garzia et al. 2009)    |
| Gmca      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 2                   | (Etxebeste et al. 2012)                     |
| AbaA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Andrianopoulos & Timberlake 1994)          |
| BcHox8    | <i>Botrytis cinerea</i>     | 3                   | (Antal et al. 2012)                         |
| BrlA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Adams et al. 1988)                         |
| DevR      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Tüncher et al. 2004)                       |
| HymA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Karos and Fischer 1996)                    |
| MedA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Busby et al. 1996)                         |
| NcCsp2    | <i>Neurospora crassa</i>    | 3                   | (Selitrennikoff et al. 1974)                |
| StuA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Miller et al. 1992)                        |
| WetA      | <i>Aspergillus nidulans</i> | 3                   | (Boylan et al. 1987)                        |
| MoCon7    | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | 4                   | (Cao et al. 2016)                           |
| MoConX2   | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | 4                   | (Cao et al. 2016)                           |
| MoConX3   | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | 4                   | (Cao et al. 2016)                           |
| MoConX4   | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | 4                   | (Cao et al. 2016)                           |
| MoGcf4    | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | 4                   | (Cao et al. 2016)                           |

They are sorted based on their participation in the balance between asexual and sexual developmental cycles (Group 1), the induction of asexual development (Group 2) and progression of asexual development (Group 3). Those proteins not included in any of these three groups are in Group 4.



**Figure 1.** Genetic control of asexual multicellularity in *A. nidulans*. Stimuli such as darkness or carbon dioxide induce the activity of proteins that control the balance between sexual and asexual CM programs (Group 1). In general, with the exception of OsaA and UrdA (see below), these proteins inhibit the expression of *brlA* and induce the synthesis of sexual structures known as cleistothecia. Signals such as light and the exposition of vegetative cells to the air environment induce UDA transduction pathways (Group 2), resulting in the inhibition of growth (through FlibA) and the induction of *brlA* expression. In addition, UDA activity inhibit sexual development through, at least, UrdA and, probably, also OsaA. Expression of *brlA* is also controlled by chromatin remodelers such as GcnE (and also LaeA in *A. fumigatus*). BrlA activity (first as BrlA $\beta$  form then as BrlA $\alpha$  form) initiates the CDP pathway (Group 3), resulting in the formation of asexual CM structures known as conidiophores. A feedback regulatory loop controlled by VosA informs about the completion of the process by directly inhibiting the expression of *brlA*. The upstream reading frame (uORF) adds a translational layer of control of BrlA activity, since uORFs block ribosomes, decreasing the efficiency of mRNA translation. The position of the arrows indicating binding of each TF at the promoter of *brlA* do not necessarily correspond to the exact position of their binding sites. See references within the main text.

in the presence or absence of light, its nuclear/cytoplasmic localization (Stinnett et al. 2007) and its interaction partners (Bayram et al. 2008). One of these partners is VelB, which also interacts with VosA, forming transitory complexes that, as a general rule, promote sexual development and repress asexual development in the dark (see references within (Bayram and Braus 2012)). The nuclear activity of VeA is also controlled by a MAPK module that connects signals received at the tip with the transcriptional control of secondary metabolism (Bayram et al. 2012). This module also controls the induction of sexual multicellularity programs through SteA.

NsdC positively activates sexual development (Kim et al. 2009) while the role of NsdD in the control of multicellularity programs in fungi has been analyzed more deeply (Figure 1; Table 2). Besides being a key activator of sexual development (Han et al. 2001), NsdD directly represses asexual development in *A. nidulans*, by directly binding to the promoter of the master gene *brlA* (see group 3) (Lee et al. 2014; Lee et al. 2016). Finally, WOPR-type and HLH-type TFs OsaA and UrdA were recently characterized functionally in *A. nidulans* (Alkahyyat et al. 2015; Oiartzabal-Arano et al. 2015). The absence of either of them causes very similar phenotypes in which the concentration of asexual spores is significantly reduced while sexual multicellularity is

heightened. For this reason, both TFs were classified as repressors of sexual development.

### Group 2: Inducers of asexual development

The regulators included in this second group participate in the transcriptional activation of the genes that control the morphological transitions leading to asexual spore production (group 3; Table 2). In *A. nidulans*, this role is carried out by a group of proteins referred to as UDAs or upstream developmental activators (Wieser et al. 1994; Oiartzabal-Arano et al. 2016). UDAs determine whether the expression of *brlA*, and thus, group 3 genes and asexual spore production, are induced in polarly growing vegetative cells (hyphae) (Figure 1, orange). This is why loss-of-function mutations or deletion of these genes block asexual multicellularity and perpetuate the growth of vegetative cells. Thus, in general, UDA proteins act as signal transducers controlling the transition from simple multicellularity (the mycelium) (Nagy et al. 2018) to complex three-dimensional asexual structures that in the case of *A. nidulans* are formed by the six cell-types that comprise the conidiophore (Adams et al. 1998; Etxebeste et al. 2010).

The most widely characterized group of UDA proteins in *A. nidulans* are the Flib proteins FlibA, FlibB, FlibC, FlibD and FlibE (orange in Figure 1; Table 2)

(Wieser et al. 1994). Genetic and molecular analyses placed these regulators into three pathways. FlbA antagonizes the activity of a trimeric G-protein complex formed by FadA, GpgA and SfaD in order to inhibit cell proliferation and induce asexual development (Lee & Adams 1994; Yu et al. 1996). FlbC is a C2H2-type TF that binds the promoter of *brlA*, controlling its expression directly (Kwon et al. 2010). Finally, FlbB, FlbD and FlbE are key players of a characteristic signal transduction pathway connecting the growth region of vegetative cells, the hyphal tip, with nuclei (Oiartzabal-Arano et al. 2016). The bZIP-type TF FlbB is transported to the tip assisted by FlbE (Herrero-Garcia et al. 2015). FlbB migrates from the tip to nuclei, where jointly with the cMyb TF FlbD binds the promoter of *brlA* and induces asexual spore production (Garzia et al. 2010; Herrero-Garcia et al. 2015).

Besides these five regulators, we included in this second group an additional *A. nidulans* protein and three from the leotiomycete pathogen *B. cinerea*. *A. nidulans* GmcA is a predicted glucose-methanol-choline oxidoreductase required for asexual multicellularity under alkaline pH conditions (Etxebeste et al. 2012). BcLTF2 and BcLTF3 are recently characterized, interdependent, light-induced TFs from *B. cinerea* (Brandhoff et al. 2017) while BcLTF7 is the ortholog of MoConX7, a C2H2 zinc-finger TF whose absence reduces conidia production in *Magnaporthe oryzae* by more than 60% (Cao et al. 2016).

### Group 3: Spatiotemporal control of the synthesis of asexual multicellular structures

From the above-referenced literature, it can be concluded that, in *A. nidulans*, a first layer of transcriptional control at the promoter of the master gene *brlA* is exerted by both activators and repressor TFs belonging to different transduction pathways (Lee et al. 2016). Once *brlA* expression is induced, a cascade of transcriptional regulators is activated (green in Figure 1; Table 2) (Adams et al. 1998). This pathway is known as CDP or Central Developmental Pathway (Mah and Yu 2006) and controls the expression of an array of genes required, for example, in the synthesis of the cell-wall or pigmentation of spores (see references within (Adams et al. 1998); these auxiliary proteins have not been considered in the analyses below).

There are additional layers of transcriptional control of the expression of *brlA*. The second one is the existence of two transcripts of *brlA*, *brlA $\alpha$*  and *brlA $\beta$*  (Han et al. 1993). *brlA $\beta$*  codes for a polypeptide 23 amino acids longer than *BrIA $\alpha$* . Each isoform is required at

different stages of asexual multicellular development: *brlA $\beta$*  mutants are blocked at early-mid asexual CM development while *brlA $\alpha$*  mutants fail to proceed with the production of asexual spores (Fischer and Kues 2006). Transcription of *brlA $\beta$*  starts upstream to that of *brlA $\alpha$* , and the transcript contains an intron in the 5'-UTR region. Transcription of *brlA $\alpha$*  starts within the intron of *brlA $\beta$*  (our RNAseq results; (Garzia et al. 2013; Oiartzabal-Arano et al. 2015)).

A third layer is established by GcnE, the histone acetyltransferase subunit of the Spt-Ada-Gcn acetyltransferase (SAGA) complex, which strongly suggests that histone acetylation and chromatin remodeling at the promoter of *brlA* are key events in the development of asexual CM structures (Cánovas et al. 2014). This is supported by a recent study in *A. fumigatus*, which reports that LaeA prevents heterochromatic marks in the promoter of *brlA*, allowing its activation (Lind et al. 2018).

Fourthly, feedback regulatory loops on *brlA* mediated by group 1 (VosA) or group 3 (AbaA; see below) TFs have also been described, refining the expression and activity of BrIA isoforms and informing about the completion of the process (Aguirre 1993; Ni and Yu 2007). Finally, the presence of a uORF just 3' of the initiation site of *brlA $\beta$*  transcript adds a translational layer of control of BrIA concentration in the cell.

It remains to be determined whether BrIA counterparts and associated complex regulatory mechanisms are coded in the genomes of species outside the order eurotiales (see next sections). However, *brlA* constitutes a control point in *A. nidulans* and, as far as known, it is the only way to induce the CDP pathway and asexual CM, thus ensuring that all the cell-types that form the conidiophore are generated correctly in space and time. The conservation of TFs AbaA and WetA, which together with BrIA form the backbone of the CDP pathway, and StuA and MedA, has also been analyzed (see also (Ojeda-López et al. 2018)). AbaA is a TF of the ATTS family (Andrianopoulos and Timberlake 1991) required in the terminal stages of asexual development (Andrianopoulos and Timberlake 1994) while WetA controls gene expression in asexual spores and is required for their integrity and the deposition of diverse metabolites (Sewall et al. 1990; Marshall and Timberlake 1991; Wu et al. 2018). StuA and MedA purportedly control the activity of CDP factors in space and time (Miller et al. 1992; Busby et al. 1996).

Four additional proteins were included in this third group: the bHLH-type TF DevR, the homeobox TF BcHox8, HymA and the CP2-like TF NcCsp2. The deletion mutant of *devR* initiated conidiophore development in *A. nidulans* but failed to proceed with conidia

production and instead generated secondary conidiophores (Tüncher et al. 2004). The absence of *B. cinerea* BcHox8 caused the generation of conidiophores and conidia with abnormal morphology (Antal et al. 2012). HymA has been included in this group as a protein that, being conserved in higher eukaryotes, is necessary at middle-late stages of asexual CM development (Karos and Fischer 1996). *N. crassa* has been an important model for the study of asexual development in fungi and multiple regulators of this process are known (see references within (Park and Yu 2012)). Among them, NcAcon3, required for the formation of major constriction sites, is the ortholog of MedA while NcCsp1, which is required for the separation of conidia, is the ortholog of BcLTF3 (see Group 2). In this study, we used NcCsp2 as a query, a TF also required for the separation of conidia (Selitrennikoff et al. 1974).

#### Group 4: Other regulators

Some of the regulators of asexual development analyzed in this review do not fit in any of the previously defined groups mainly because their role has been characterized in model fungi distant from *A. nidulans*. Cao and collaborators carried out a comprehensive characterization of the roles of 47 C2H2-type TFs in the development and pathogenicity of *M. oryzae* (Cao et al. 2016) and described that individual deletions of several of them caused at least an 80% decrease in conidia production without causing a significant inhibition of colony growth. Therefore, MoGcf4, MoConX2, MoConX3, MoConX4 and MoCon7 were included in the list of TFs analyzed in this work.

#### TFs controlling multicellular development in fungi emerged gradually in evolution

The sequences of the 33 regulators described above (Table 2) were retrieved from FungiDB (<http://fungidb.org/fungidb/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or AspGD (<http://www.aspgd.org/>) databases. The 503 fungal proteomes were divided into sub-databases prior to analysis: (1) agaricomycotina (85 species); (2) blastocladiomycota (1 species), chytridiomycota (4 species), cryptomycota (1) and zoopagomycota (1 species); (3) microsporidia (24 species); (4) mucoromycota (14 species); (5) pezizomycotina (256 species); (6) pucciniomycotina (11 species) and ustilagomycotina (18 species); (7) saccharomycotina (79 species); and (8) taphrinomycotina (9 species). The sequence of each regulator was individually processed as the query in BLAST searches against each sub-database. Additional

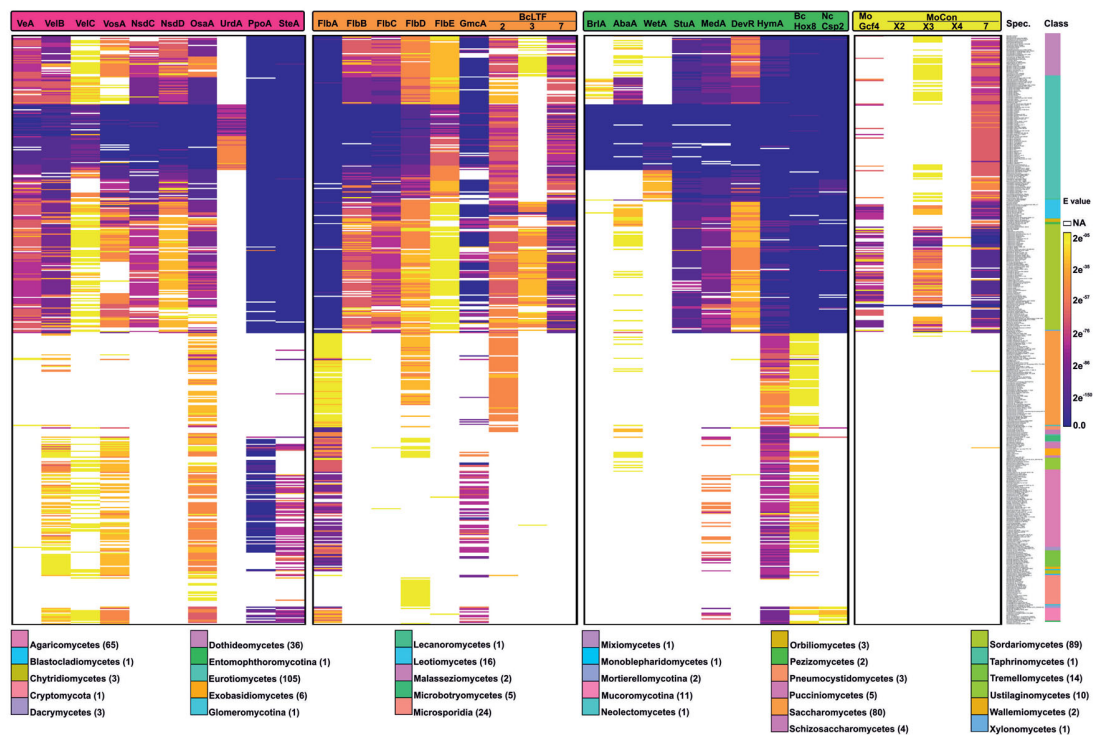
functional annotation was performed by searching subsets of the EnsemblFungi database (<https://fungi.ensembl.org/index.html>) using emapper-1.0.3 (Huerta-Cepas et al. 2017). Additionally, HMM profiles for regulators were obtained using sequence searches of the eggNOG 5.0 database (<http://eggnogdb.embl.de/#/app.home>) (Huerta-Cepas et al. 2016; Huerta-Cepas et al. 2019).

All hits from each query were analyzed based on the following criteria. First, the presence, located in a similar position within the hit, of the characteristic domain(s) of the query. Second, a threshold coverage value was established and used as criteria for exclusion. In general, every hit with a query coverage below 35% was not considered as homologous and was consequently excluded from the analysis. Exceptions to this rule were included. A minimum coverage of 30% was established for FlbD. For MoConX3 a minimum coverage was not considered, prioritizing the conservation of its two transcriptional regulatory domains at N- and C-termini of the protein. For SteA, the conservation of its two transcriptional regulatory domains at N- and C-termini or a minimum coverage of 35% was accepted. Third, BLASTing each specific hit against the genome database of the query species ([www.aspgd.org](http://www.aspgd.org) or [www.fungidb.org](http://www.fungidb.org)) had to return the query as the first hit (confirmatory reverse retrieval).

The application of our criteria, especially the confirmatory reverse retrieval, led us to conclude, for example, that VeA is conserved, almost exclusively, in pezizomycotina, which contrasts with previous studies that described its presence in species outside of this subphylum (Bayram and Braus 2012). Interestingly, we obtained the same hits for VeA and VosA in most species outside of pezizomycotina. In the case of VelC, the presence of the velvet domain in the C-terminus of the protein was prioritized over the confirmatory reverse retrieval results (velvet domains of both VeA and VosA are located in the N-terminus).

Results strongly suggest that three proteins belonging to the velvet family of regulators (VelB, VelC and VosA) are present in nearly all fungal clades, indicating that this is one of the most ancient fungal systems coupling signal transduction with developmental and metabolic control. Ojeda-López and colleagues analyzed the conservation of the four velvet proteins of *A. nidulans* in 54 proteomes representing different fungal phyla, subphyla and classes, and proposed different hypotheses on the evolution of this family of regulators (Ojeda-López et al. 2018).

By applying these criteria, we generated lists of orthologs (Supplementary Table available online),



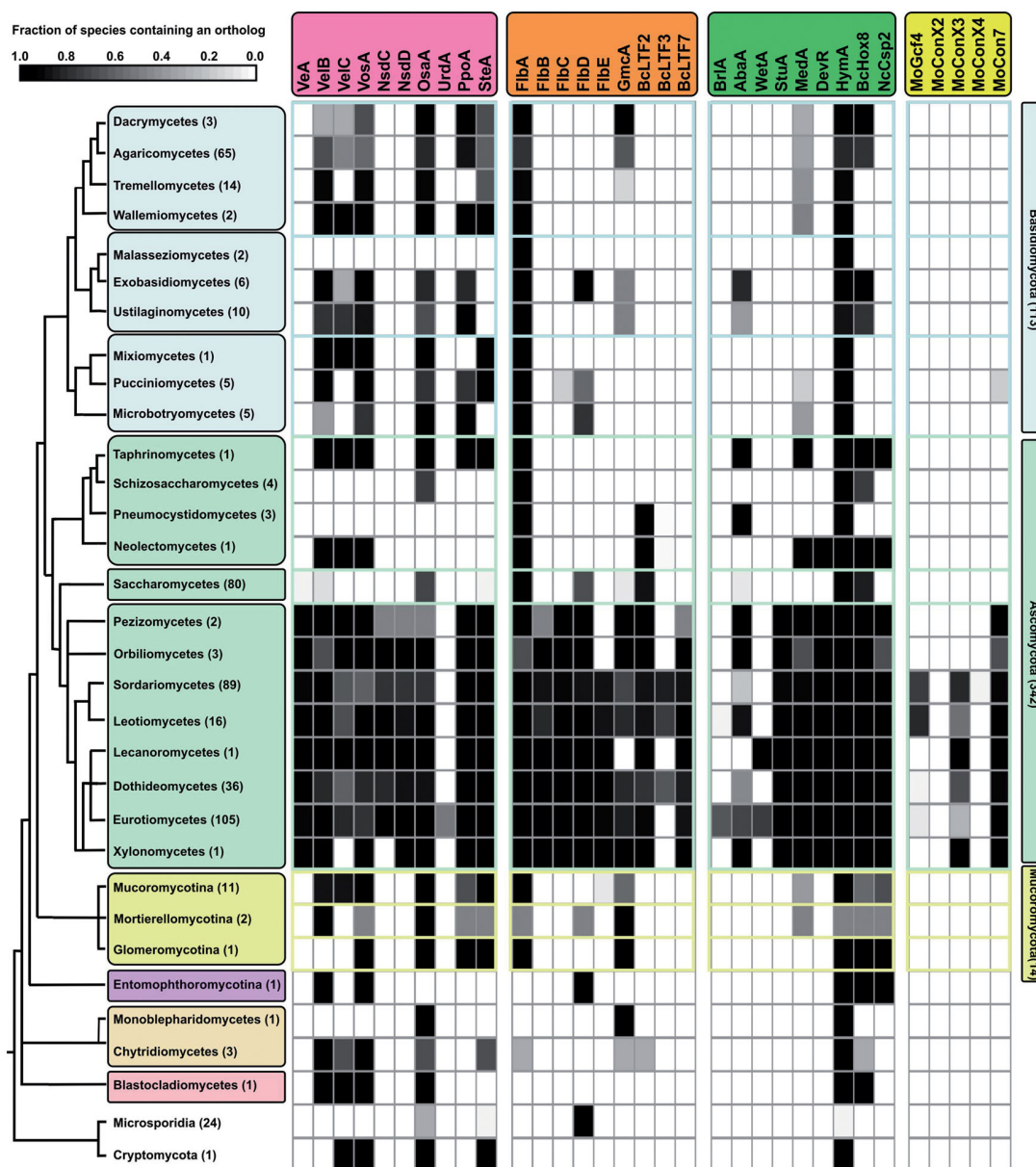
**Figure 2.** Conservation of developmental regulators in fungi. Heatmap showing the expected (e) values of the orthologs of each developmental regulator identified in each of the species of the database. White colour (NA) indicates an absence of an ortholog in that species or that a hit was discarded because it was below our threshold criteria (see main text). The colour bar on the right indicates the class (labeled at bottom of figure) of those species.

which include the accession code of each hit, coverage, expected and score values, as well as the best hit resulting from a BLAST analysis of that sequence against the reference database (the lowest expected value was  $3.00 \times 10^{-5}$ , corresponding to the *Thielaviopsis punctulata* ortholog of F1bE KKA29905). The heatmap in Figure 2 was generated with the expected values of all hits of those queries considered as orthologs (Supplementary Table available online).

The heatmap in Figure 3 describes the fraction of species within each class with an ortholog of each developmental regulator (the Supplementary Table is available online). Overall, three patterns of conservation applicable to the four groups of regulators described were observed. First, the conservation of 13 of the regulators (all but one being TFs) was limited to all or nearly all classes within ascomycota or pezizomycotina. Second, six TFs were conserved only in specific classes within pezizomycotina. Here we observed sub-patterns of conservation, with some of these regulators being conserved only in one class or specific orders, families, or even species (see Figure 2), while others were found in more than one. Finally, we found that 14 of the proteins analyzed were also conserved in orders outside of ascomycota/pezizomycotina clades, suggesting a more ancient emergence in evolution (see below).

By identifying the most phylogenetically ancient classes in which orthologs of the analyzed query proteins could be detected, we tried to estimate the relative phylogenetic age (phylostrata) or point in which each of the regulators could have emerged in evolution (Krizsán et al. 2019). With this aim, the conservation patterns shown in Figure 3 were placed on a phylogenetic tree based on Spatafora et al. (2017) as the reference (Figure 4). A protein was considered as conserved in a specific class when orthologs were identified in at least 40% of the total number of species in our database representing that class (Nguyen et al. 2017).

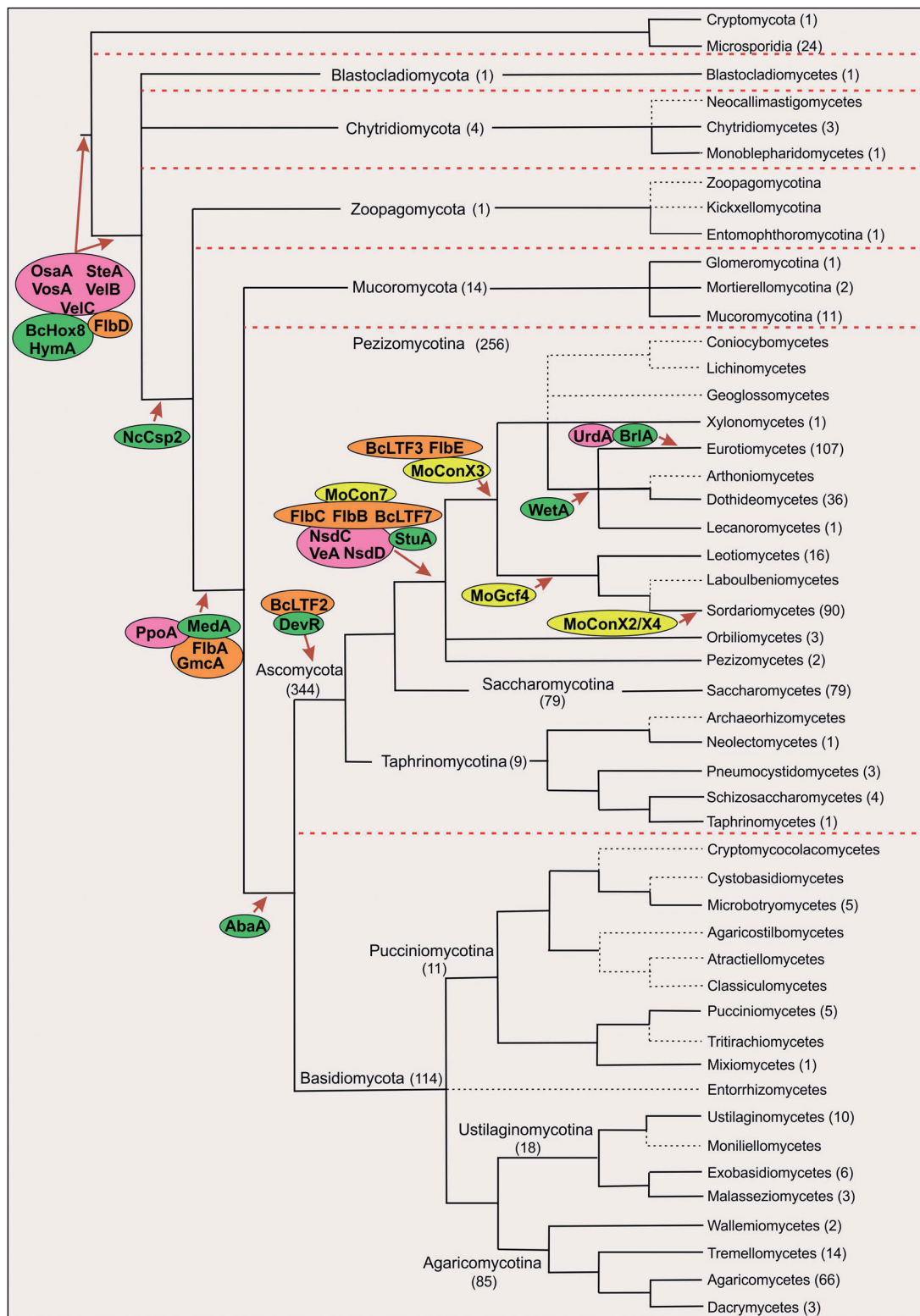
Although in some cases it is difficult to track the emergence of specific regulators due to the under-representation of specific classes in our database, Figure 4 strongly suggests that TFs controlling CM in fungi emerged sequentially together with the split of major clades. Three of the velvet proteins of *A. nidulans* (VosA, VelB and VelC), together with additional TFs such as F1bD, OsaA and BcHox8, as well as HymA, are apparently the most ancient regulators of fungal development (a BLAST of HymA sequence against non-fungal UniProtKB taxonomic subsets at <https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/> confirmed that it is conserved in higher eukaryotes as well (Karas and Fischer 1996)).



**Figure 3.** Conservation of regulators of asexual development in those classes represented in our database. The phylogenetic tree represents, respectively, the three subphyla within basidiomycota (agaricomycotina, ustilagomycotina and pucciniomycotina), the three subphyla within ascomycota (taphrinomycotina, saccharomycotina and pezizomycotina), mucoromycota, zoopagomycota, chytridiomycota, blastocladiomycota, microsporidia and Cryptomycota. The tree was manually drawn based on that published by (Spatafora et al. 2017). The number of representative species of each class in our database is indicated in brackets. The grayscale indicates the fraction of species within each class containing an ortholog of each developmental regulator (see also Table S1). Conservation was determined by BLAST and eggNOG analyses, according to the criteria described in the main text.

The emergence of multiple regulators in the ascomycota or pezizomycotina clades is in line with the observation by Krizsán et al. (2019) that there is a characteristic enrichment of agaricomycetes-specific TFs and suggests that the development of CM patterns in these phyla and subphyla was accompanied by the emergence of several new developmental regulators enabled by this TF expansion (Figure 4). Also in line

with the hypotheses of Nguyen et al. based on the genome sequencing of *Neoelecta irregularis* (a taphrinomycete which develops sexual CM structures), regulators such as BcLTF2 or DevR probably are ancestral in the ascomycota, and DevR (but not BcLTF2) have probably been lost during simplification of budding and fission yeasts (Nguyen et al. 2017). As far as we know, there is no report on any role in sexual (sclerotial) development



**Figure 4.** Emergence of regulators of asexual development. By drawing a phylogenetic tree based on Spatafora and colleagues as a reference (Spatafora et al. 2017), the figure shows the number of species (in brackets; a total of 503) of each phyla, subphyla and class represented in the database of fungal proteomes used in this study. Classes not represented in our database are indicated by black dotted lines in the tree. Additional dotted lines have been included to separate major clades. The locations of the regulators of asexual development in the tree are based on the results obtained in BLAST and eggNOG analyses and suggest an approximate period for their emergence. A protein was considered as conserved in a specific class when orthologs were identified in at least 40% of the total number of species representing that class in our database. See also Figures 2 and 3.

for the regulator of *B. cinerea* conidiation BcLTF2 (Brandhoff et al. 2017). However, BcLTF3 has been described as a TF with a dual function in development (see below). Of note is the conservation pattern of NcCsp2, since it is conserved in pezizomycotina, mucoromycota, zoopagomycota and the taphrinomycotina *Neolecta irregularis* and *Saitoella complicata*, but not in saccharomycotina, the rest of taphrinomycotina or basidiomycota species analyzed in this work. This suggests an early emergence of NcCsp2 and the progressive loss in basidiomycota, saccharomycotina and specific clades within taphrinomycotina.

MoConX3, F1bE and BcLTF3 (the latter has a dual function in the control of development since it is essential for conidiogenesis but represses conidiophore development by repressing *Bcltf2* in light and darkness; see (Brandhoff et al. 2017)) may have emerged after the split of orbiliomycetes and pezizomycetes, while *M. oryzae* MoGcf4 is conserved in leotiomycetes and sordariomycetes. Furthermore, *A. nidulans* UrdA and BrlA, as well as *M. oryzae* MoConX2 and MoConX4 seem to be specific to eurotiomycetes and sordariomycetes, respectively. However, there is a variable degree of conservation among these regulators. UrdA is conserved exclusively in eurotiales, showing a variable degree of conservation in this order (see Figure 2). The C2H2-type regulator MoConX2 shows a high sequence divergence compared to the best hits in other sordariomycetes, being located in an independent clade (see the analysis of MoConX2 sequence in Figure S1), while we found only three putative ortholog sequences for MoConX4, all of them with low coverage and expected values (see Figure 2). This observation strongly suggests that the emergence of specific TFs controlling asexual multicellularity may be recent and may lead to further morphological diversification and specialization. The possibility of these TFs emerging sooner in evolution and being gradually lost in almost all species is unlikely.

Presence of BrlA orthologs is detected in the order eurotiales within eurotiomycetes (also probably in some chaetothyriales species and the single verrucariales species analyzed, *Endocarpon pusillum*), but not in onygenales (de Vries et al. 2017). The fact that BrlA emerged in evolution much later than TFs that in *A. nidulans* are located either upstream (F1bA-E) or downstream (AbaA, WetA, StuA, MedA) in the genetic pathways inducing/controlling the generation of asexual CM structures suggests that its emergence had a profound effect in the modification of pre-existing democracy/hierarchy networks (see Discussion).

## Discussion

Multicellularity represents a key landmark in the evolution of organisms. CM is differentiated from simple multicellularity based on features such as the proportion of cells in direct contact with the environment, cell adhesion and communication, the existence of a developmental program controlling morphological transitions, programmed cell death events or the generation of 3D structures (see references within (Nagy et al. 2018)). CM has emerged at least five times in evolution, one of them in fungi. There are two types of CM programs in fungi, sexual and asexual cycles. However, investigations into the fundamentals of the emergence and evolution of CM in fungi have been dominated by studies of sexual development. Here we propose that the study of the emergence/evolution of regulators that control the initiation/progression of asexual development in specific fungal lineages can be an informative way to elucidate the mechanisms enabling asexual CM and potentially leading to evolutionary convergence. For example, the generation of conidiophores meets most of the traits of CM mentioned above. Although all cell-types are in direct contact with the environment, which contrasts with (asexual or sexual) fruiting bodies, conidiophores are 3D structures generated following a pre-defined genetic program that is tightly connected to programmed cell death pathways (Mims et al. 1988; Adams et al. 1998; Pócsi et al. 2009; Gonçalves et al. 2017). Two additional advantages reinforce the usefulness of asexual development as a model for the study of CM. One is the limited number of cell-types involved. In *A. nidulans* conidiophores, the foot-cell (the base of the structure), the stalk (which grows polarly from the foot-cell) and the vesicle (the result of the isotropic growth of the tip of the stalk) form a single unit (Mims et al. 1988). A multipolar budding process at the vesicle generates metulae, which subsequently bud into two phialides, each one generating long chains of asexual spores (conidia). Secondly, and again using the example of *A. nidulans* conidiophores, it can be suggested that the timely generation of each cell-type is controlled by a limited number of transcriptional networks and TFs (Etxebeste et al. 2010).

Most of these TFs (a significant number at least) are known in *A. nidulans* and the functional characterization of their roles in asexual development has enabled their assignment to pathways and the elucidation of their hierarchical or democratic relationships (Bar-Yam et al. 2009; Jothi et al. 2009). For example, *brlA* expression is dependent on the activity of UDA TFs (hierarchy) while, the expression, protein levels, localization and transcriptional activity of both F1bB and F1bD depend



on the activity of each other (democracy) (our unpublished results; (Garzia et al. 2010)). Our results strongly suggest that UDA TFs and others controlling the initiation, progression or balance of asexual development are widely conserved in most classes within pezizomycotina. Nevertheless, the functional characterization of several of these orthologs clearly shows that sequence conservation does not guarantee the conservation of the same role in the control of development. For example, the deletion of the orthologs of *flbB*, *flbE* and *fluG* did not alter conidia production or morphology in *Fusarium graminearum* while deletion of *fgflbC* caused approximately a 50% decrease in conidia production and deletion of *fgflbD* completely blocked the induction of asexual development (Son et al. 2014). Thus, a democratic relationship between FgFlbB and FgFlbD in the control of conidiation in this sordariomycete is very unlikely. Tiley et al. have recently shown that the deletion of the *flbB* ortholog in the dothideomycete *Zymoseptoria tritici* had no effect on asexual spore production or pathogenicity (Tiley et al. 2018). Furthermore, deletion of *M. oryzae MoFlbB* exacerbated conidiation instead of inhibiting it (Tang et al. 2015), suggesting that *MoFlbB* performs an opposite role compared to the *A. nidulans* ortholog. *FlbB* orthologs conserve different domains and residues compared to related TFs that control the response to oxidative stress (Vivancos et al. 2004; Cortese et al. 2011; Herrero-Garcia et al. 2015). This may indicate that FlbB orthologs retain mechanistic features enabling them to control signal transduction, such as importation into nuclei or transcriptional regulation, but can participate in the alternate cellular process in different species. Additionally, the emergence of BrlA in eurotiales may have redirected the role of FlbB towards the induction of asexual development (see below).

Similarly, deletion of the *N. crassa* ortholog of *flbC*, *flb-3*, has pleiotropic effects, affecting hyphal morphology as well as sexual and asexual development (Boni et al. 2018). As shown in Figure 1, FlbC regulates *brlA* expression in *A. nidulans* by direct binding to its promoter (Kwon et al. 2010). However, as a sordariomycete, *N. crassa* lacks a *brlA* ortholog and Flb-3 has developed the ability to bind the promoters of *aba-1*, *wet-1* and *vos-1*, which code for proteins orthologous to *A. nidulans* CDP TFs AbaA, WetA and VosA. Unexpectedly, the authors reported that these three genes are apparently not required for development in *N. crassa* (Boni et al. 2018). As evidence of the complexity in the organization of the networks controlling development in fungi, in the insect pathogen *Beauveria bassiana*, a sordariomycete that consequently lacks a *brlA* ortholog,

deletion of *BbwetA* and *BbvosA* affects conidia number and quality (Li et al. 2015). In a context in which sequence conservation does not correlate with conservation of the same cellular function, and new TFs controlling development emerge as the different fungal orders, families, genera and probably even species themselves differentiate implies that broadening the search for mutants impaired in asexual development is necessary in as many reference systems as possible. Thus, mutant screenings such as the one carried out in *B. cinerea* for the identification of light induced TFs (Cohrs et al. 2016; Schumacher 2017; Brandhoff et al. 2017) or the identification and characterization of proteins controlling asexual sporulation in agaricomycetes (reviewed by (Kües et al. 2016)) serve as examples and must be acknowledged. Overall, these examples suggest that the application of known activities and relationships of developmental regulators from one model to related species cannot be treated as a given, and may misdirect research. Furthermore, collaborative initiatives should integrate the data generated not only from evolutionary and network organization perspectives, but also with the understanding that there is the potential of discovering novel therapeutic targets within those pathways, since, after all, they control the spread of mycoses. In this context, and considering the fact that asexual reproduction is prolific and results in wide dispersion, random mutation of spores could promote speciation.

Recent reports propose that an increase in the number of protein-coding genes is not the only cause of the development of CM in fungi, indicating that there are other sources of genetic innovations (Nagy 2017; Nguyen et al. 2017). The observations described in this text lead us to propose that asexual multicellularity in pezizomycotina evolved convergently, at least, as the result of a random and stepwise emergence of TFs and additional regulators. The emergence or re-adaptation of regulators within the pre-existing transcriptional networks would cause their rewiring, meaning that the great diversity of asexual morphologies in fungi is the result of random re-organizations of genetic pathways. In fact, inefficient re-organizations to developmental regulation may have led to extinction/irrelevance of fungal lines. The emergence of *brlA* arises as a key event in the re-design of genetic networks and the ability to generate asexual CM structures in eurotiales. It is tempting to suggest that the promoter of *brlA* and its gene products developed, respectively, the ability to recruit upstream and transcriptionally control downstream TFs. Processes such as this could also redirect the role of proteins that are widely conserved in fungi

(such as the psi factor-producing oxygenase PpoA or the oxidoreductase GmcA) or conserved in higher eukaryotes (such as HymA). Consequently, we firmly believe that the elucidation of the mechanisms enabling the transition to asexual development in fungal species such as *A. nidulans* could make an important contribution to the understanding of the evolution of CM.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

Work at the UPV/EHU lab was funded by Grant EHUA15/08 to O.E. Work at CIB-CSIC was funded by MINECO (BFU2015-66806-R) and MICIU (RTI2018-094263-B-100) to E.A.E (both partially supported by FEDER, EU). A.O held a predoctoral fellowship from the Basque Government.

## ORCID

Oier Etxebeste  <http://orcid.org/0000-0002-9786-6091>  
 Eduardo A. Espeso  <http://orcid.org/0000-0002-5873-6059>  
 Marc S. Cortese  <http://orcid.org/0000-0002-5903-0525>

## References

- Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 54:353–362.
- Adams TH, Wieser JK, Yu J-H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:35–54.
- Aguirre J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol*. 8:211–218.
- Ahmed YL, Gerke J, Park H-S, Bayram Ö, Neumann P, Ni M, Dickmanns A, Kim SC, Yu J-H, Braus GH, et al. 2013. The Velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- $\kappa$ B. *PLoS Biol*. 11: e1001750.
- Alkahyyat F, Ni M, Kim SC, Yu J-H. 2015. The WOPR domain protein OsaA orchestrates development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*. 10:e0137554.
- Andrianopoulos A, Timberlake WE. 1991. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell*. 3:747–748.
- Andrianopoulos A, Timberlake WE. 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.
- Antal Z, Rasclé C, Cimerman A, Viaud M, Billon-Grand G, Choquer M, Bruel C. 2012. The Homeobox BcHOX8 gene in *Botrytis cinerea* regulates vegetative growth and morphology. *PLoS One*. 7:e48134.
- Bar-Yam Y, Harmon D, de Bivort B. 2009. Systems biology. Attractors and democratic dynamics. *Science*. 323: 1016–1017.
- Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL, Maruyama J, Valerius O, Rizzoli SO, Ficner R, Irniger S, Braus GH. 2012. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet*. 8:e1002816.
- Bayram Ö, Braus GH. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*. 36:1–24.
- Bayram Ö, Braus GH, Fischer R, Rodríguez-Romero J. 2010. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol*. 47:900–908.
- Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon N-J, Keller NP, Yu J-H, et al. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*. 320:1504–1506.
- Bebber DP, Holmes T, Gurr SJ. 2014. The global spread of crop pests and pathogens. *Glob Ecol Biogeogr*. 23: 1398–1407.
- Bhattacharya S. 2017. Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature*. 542:145–146.
- Boni AC, Ambrósio DL, Cupertino FB, Montenegro-Montero A, Virgilio S, Freitas FZ, Corrocher FA, Gonçalves RD, Yang A, Weirauch MT, et al. 2018. *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor. *Fungal Biol*. 122:570–582.
- Boylan MT, Mirabito PM, Willett CE, Zimmerman CR, Timberlake WE. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*. 7:3113–3118.
- Brandhoff B, Simon A, Dornieden A, Schumacher J. 2017. Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators BcLTF3 and BcREG1. *Curr Genet*. 63:931–949.
- Busby TM, Miller KY, Miller BL. 1996. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans medusa* mutation by altered dosage of the *bristle* and *stunted* genes. *Genetics*. 143:155–163.
- Callaway E. 2016. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. *Nature*. 532:421–422.
- Cánovas D, Marcos AT, Gacek A, Ramos MS, Gutiérrez G, Reyes-Domínguez Y, Strauss J. 2014. The histone acetyltransferase GcnE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development. *Genetics*. 197: 1175–1189.
- Cao H, Huang P, Zhang L, Shi Y, Sun D, Yan Y, Liu X, Dong B, Chen G, Snyder JH, et al. 2016. Characterization of 47 Cys2-His2 zinc finger proteins required for the development and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *New Phytol*. 211:1035–1051.
- Cohrs KC, Simon A, Viaud M, Schumacher J. 2016. Light governs asexual differentiation in the grey mould fungus *Botrytis cinerea* via the putative transcription factor BcLTF2. *Environ Microbiol*. 18:4068–4086.
- 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.

- de Castro F, Bolker BM. 2005. Parasite establishment and host extinction in model communities. *Oikos*. 111: 501–513.
- de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, et al. 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol*. 18:28.
- Editorial Nature Microbiology. 2017. Stop neglecting fungi. *Nat Microbiol*. 2:17120.
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U. 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol*. 18:569–576.
- Etxebeste O, Herrero-García E, Cortese MS, Garzia A, Oiartzabal-Arano E, de los Ríos V, Ugalde U, Espeso EA. 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, Ni M, Garzia A, Kwon NJ, Fischer R, Yu JH, Espeso EA, Ugalde U. 2008. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 7:38–48.
- Fischer R, Kües U. 2006. Asexual sporulation in mycelial fungi. In: Kües U, Fischer R, editors. *Growth, differentiation and sexuality*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 263–292.
- 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.
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U. 2009. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol*. 71:172–184.
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Ugalde U, Espeso EA. 2010. The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 75: 1314–1324.
- Garzia A, Etxebeste O, Rodríguez-Romero J, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U. 2013. Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 12: 311–321.
- Gonçalves AP, Heller J, Daskalov A, Videira A, Glass NL. 2017. Regulated forms of cell death in fungi. *Front Microbiol*. 8: 1837.
- Han K, Han K, Yu J, Chae K, Jahng K, Han D. 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 41:299–309.
- Han S, Navarro J, Greve RA, Adams TH. 1993. Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J*. 12:2449–2457.
- Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr*. 5(4). DOI:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
- Herrero-García E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Cortese MS, Markina-Iñarrairaegui A, Oiartzabal-Arano E, Etxebeste O, Ugalde U, Espeso EA. 2015. Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol Microbiol*. 98:607–624.
- Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2017. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-Mapper. *Mol Biol Evol*. 34:2115–2122.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M. 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res*. 44: D286–D293.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, Mende DR, Letunic I, Rattei T, Jensen LJ, et al. 2019. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*. 47: D309–D314.
- Islam TM, Croll D, Gladieux P, Soanes DM, Persoons A, Bhattacharjee P, Shaid Hossain M, Rani Gupta D, Mahbubur Rahman M, Golam Mahboob M, et al. 2016. Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biol*. 14:84.
- Johnson AJ. 2016. Artisanal food microbiology. *Nat Microbiol*. 1:16039.
- Jothi R, Balaji S, Wuster A, Grochow JA, Gsponer J, Przytycka TM, Aravind L, Babu MM. 2009. Genomic analysis reveals a tight link between transcription factor dynamics and regulatory network architecture. *Mol Syst Biol*. 5:294.
- Karos M, Fischer R. 1996. *hymA* (hypha-like metulae), a new developmental mutant of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 142:3211–3218.
- Kim H-R, Chae K-S, Han K-H, Han D-M. 2009. The *nsdC* gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 182:771–783.
- Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford: CAN International.
- Krizsán K, Almási É, Merényi Z, Sahu N, Virágh M, Kószó T, Mondo S, Kiss B, Bálint B, Kües U, et al. 2019. Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116:7409–7418.
- Kües U, Badalyan SM, Gießler A, Dörnte B. 2016. Asexual sporulation in Agaricomycetes. In: Wendland J, editor. *Growth, differentiation and sexuality*. Cham: Springer International Publishing; p. 269–328.
- Kwon N-J, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu J-H. 2010. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 77: 1203–1219.
- Lee BN, Adams TH. 1994. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol*. 14:323–334.
- Lee M-K, Kwon N-J, Choi JM, Lee I-S, Jung S, 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, Yu J-H. 2016. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep*. 6:28874.

- Li F, Shi H-Q, Ying S-H, Feng M-G. 2015. WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:10069–10081.
- Lind AL, Lim FY, Soukup AA, Keller NP, Rokas A. 2018. An LaeA- and BrIA-dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere.* 3:pii: e00050–18.
- Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, et al. 2017. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis.* 64:134–140.
- Mah J-H, Yu J-H. 2006. Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell.* 5:1585–1595.
- Malaker PK, Barma NCD, Tiwari TP, Collis WJ, Duveiller E, Singh PK, Joshi AK, Singh RP, Braun H-J, Peterson GL, et al. 2016. First report of wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *tritricum* in Bangladesh. *Plant Dis.* 100: 2330.
- Marshall MA, Timberlake WE. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol.* 11: 55–62.
- McCallum H, Dobson A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol Evol (Amst).* 10:190–194.
- Meyer V, Andersen MR, Brakhage AA, Braus GH, Caddick MX, Cairns TC, de Vries RP, Haarmann T, Hansen K, Hertz-Fowler C, et al. 2016. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol* 3:6.
- Miller KY, Wu J, Miller BL. 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6:1770–1782.
- Mims CW, Richardson EA, Timberlake WE. 1988. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma.* 144:132–141.
- Mooney JL, Yager LN. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4:1473–1482.
- Nagy LG, Kovács GM, Krizsán K. 2018. Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 93:1778–1794.
- Nagy LG. 2017. Evolution: complex multicellular life with 5500 genes. *Curr Biol.* 27:R609–R612.
- Nguyen TA, Cissé OH, Yun Wong J, Zheng P, Hewitt D, Nowrousian M, Stajich JE, Jedd G. 2017. Innovation and constraint leading to complex multicellularity in the Ascomycota. *Nat Commun.* 8:14444.
- Ni M, Yu J-H. 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2:e970.
- Oiartzabal-Arano 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.
- Oiartzabal-Arano E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Espeso EA, Etxebeste O. 2016. Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 62:371–377.
- Ojeda-López M, Chen W, Eagle CE, Gutiérrez G, Jia WL, Swilaiman SS, Huang Z, Park H-S, Yu J-H, Cánovas D, Dyer PS. 2018. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud Mycol.* 91:37–59.
- Park H-S, Nam T-Y, Han K-H, Kim SC, Yu J-H. 2014. VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 9:e89883.
- Park H-S, Yu J-H. 2012. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 15:669–677.
- Pócsi I, Leiter E, Kwon N-J, Shin K-S, Kwon G-S, Pusztahelyi T, Emri T, Abuknesha RA, Price RG, Yu J-H. 2009. Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *J Appl Microbiol.* 107:514–523.
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM, Fischer R. 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol.* 18:255–259.
- Rodríguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S, Fischer R. 2010. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol.* 64:585–610.
- Schumacher J. 2017. How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol.* 106:26–41.
- Selitrennikoff CP, Nelson RE, Siegel RW. 1974. Phase-specific genes for macroconidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics.* 78:679–690.
- Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE. 1990. Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev Biol.* 138:499–508.
- Son H, Kim M-G, Chae S-K, Lee Y-W. 2014. FgFlbD regulates hyphal differentiation required for sexual and asexual reproduction in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *J Microbiol.* 52:930–939.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol Spectr.* 5(5). DOI:10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016
- Stajich JE. 2017. Fungal genomes and insights into the evolution of the kingdom. *Microbiol Spectr* 5(4). DOI:10.1128/microbiolspec.FUNK-0055-2016
- Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo -Bazán L, Calvo AM. 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol.* 63:242–255.
- Tang W, Ru Y, Hong L, Zhu Q, Zuo R, Guo X, Wang J, Zhang H, Zheng X, Wang P, Zhang Z. 2015. System-wide characterization of bZIP transcription factor proteins involved in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Environ Microbiol.* 17:1377–1396.
- Tiley AMM, Foster GD, Bailey AM. 2018. Exploring the genetic regulation of asexual sporulation in *Zyoseptoria tritici*. *Front Microbiol.* 9:1859.
- Tsitsigiannis DI, Zarnowski R, Keller NP. 2004. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 279:11344–11353.
- Tüncher A, Reinke H, Martic G, Caruso ML, Brakhage AA. 2004. A basic-region helix-loop-helix protein-encoding

- gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 52:227–241.
- Vallim MA, Miller KY, Miller BL. 2000. *Aspergillus* SteA (Sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn + 2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol.* 36:290–301.
- Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayté J, Hidalgo E. 2004. Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol.* 52:1427–1435.
- Wieser J, Lee BN, Fondon JW, Adams TH. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 27:62–69.
- Wu M-Y, Mead ME, Lee M-K, Ostrem Loss EM, Kim S-C, Rokas A, Yu J-H. 2018. Systematic dissection of the evolutionarily conserved WetA developmental regulator across a genus of filamentous fungi. *MBio.* 9:pri: e01130–18.
- Yu JH, Wieser J, Adams TH. 1996. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* 15:5184–5190.



Article

# Identification and Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Impaired in Asexual Development under Phosphate Stress

Ainara Otamendi <sup>1</sup>, Eduardo A. Espeso <sup>2</sup>  and Oier Etxebeste <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of Biology, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, 20018 San Sebastian, Spain; aotamendi005@gmail.com

<sup>2</sup> Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain; eespeso@cib.csic.es

\* Correspondence: oier.echeveste@ehu.eus; Tel.: (+34)-943-018517; Fax: (+34)-943-015270

Received: 25 October 2019; Accepted: 22 November 2019; Published: 26 November 2019



**Abstract:** The transcription factor BrlA plays a central role in the production of asexual spores (conidia) in the fungus *Aspergillus nidulans*. BrlA levels are controlled by signal transducers known collectively as UDAs. Furthermore, it governs the expression of CDP regulators, which control most of the morphological transitions leading to the production of conidia. In response to the emergence of fungal cells in the air, the main stimulus triggering conidiation, UDA mutants such as the *flbB* deletant fail to induce *brlA* expression. Nevertheless,  $\Delta flbB$  colonies conidiate profusely when they are cultured on a medium containing high  $H_2PO_4^-$  concentrations, suggesting that the need for FlbB activity is bypassed. We used this phenotypic trait and an UV-mutagenesis procedure to isolate  $\Delta flbB$  mutants unable to conidiate under these stress conditions. Transformation of mutant FLIP166 with a wild-type genomic library led to the identification of the putative transcription factor SocA as a multicopy suppressor of the FLIP (Fluffy, aconidial, In Phosphate) phenotype. Dereglulation of *socA* altered both growth and developmental patterns. Sequencing of the FLIP166 genome enabled the identification and characterization of PmtC<sup>P282L</sup> as the recessive mutant form responsible for the FLIP phenotype. Overall, results validate this strategy for identifying genes/mutations related to the control of conidiation.

**Keywords:** filamentous fungi; mutagenesis; asexual development; conidiation; signal transduction; transcriptional regulation; protein O-mannosylation

## 1. Introduction

Growth and reproduction are two of the main stages in the life cycle of species, including microbes. However, considering that the resources within a specific niche are finite, species have developed a variety of mechanisms to enable them to disperse to new substrates and to begin a new life cycle. In the case of fungi, the main mechanism of dispersion is the massive production of asexual spores, maximizing the chances that at least one of them will be deposited on a substrate with the right environment for growth.

The kingdom Fungi is composed of 2–4 millions of species [1]. As a consequence, there is a great diversity in the types of asexual developmental structures and spore morphologies generated [2]. It has been suggested that this diversity is caused, at least partially, by different organizations of the genetic and molecular pathways controlling these processes [3–5]. Due to an overwhelming number of fungal species, the study of the genetic and molecular mechanisms controlling fungal asexual development has advanced on the basis of a few reference species (see, for example, References [6–8]). The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is one such reference species. A majority of the regulators of asexual development that are known were functionally characterized for the first time in this ascomycete.

In general, all asexual spores produced by localized budding and subsequent constriction from an external sporogenous cell are known as conidiospores or conidia [2]. This is the case of *A. nidulans*. The external sporogenous cells are known as phialides, but the generation of these secondary sterigmata and the long chains of conidia synthesized by each of them are the final steps of a series of morphological transitions that lead to the generation of a semi-complex developmental structure known as the conidiophore [9,10]. Each conidiophore holds thousands of conidia, and each colony can generate millions of conidiophores under the right culture conditions [11].

There are multiple stimuli inducing the production of conidia in *A. nidulans*. The most important is the emergence of polarly growing cells, the vegetative hyphae, in the aerial environment [10]. According to the accepted model for the genetic control of conidiation in this ascomycete, there are two main pathways controlling the process [6,12,13]. The first, known as the upstream developmental activation (UDA) pathway, is composed of signal transducers that collectively decide whether conidiation is triggered. The second pathway, or central developmental pathway (CDP), controls most stages of conidiophore development. The BrlA (*bristle*) transcription factor links both pathways, since its levels are controlled by UDAs and governs the expression of the CDP regulators.

FlbB, an UDA transcription factor, moves from the growing region of vegetative cells to the nuclei to control in coordination with other developmental regulators the expression of *brlA* [3,14–16]. The null mutant of *flbB* fails to induce *brlA* expression when fungal cells emerge into the air [17]. Nevertheless, the development of conidiophores may be triggered by additional stimuli such as light, nutrient starvation, presence of high salt concentrations, alkaline pH, or accumulation of specific metabolites (reviewed in Reference [13]; see also References [18–21]).  $\Delta flbB$  colonies conidiate profusely when they are cultured on a medium with a high concentration of  $H_2PO_4^-$ , suggesting that the need for FlbB activity is bypassed under these conditions.

Supplementation of media with high concentrations of sodium dihydrogen phosphate has been routinely used in our laboratories to promote conidiation in *A. nidulans*. Therefore, the existence of a specific genetic pathway that controls conidiation in response to an excess of  $H_2PO_4^-$  could be possible. To investigate this possibility, we isolated after UV-mutagenesis of the  $\Delta flbB$  strain 80 mutants showing a *fluffy* aconidial phenotype on a growth medium supplemented with phosphate (hereafter referred to as FLIP phenotype, or Fluffy in Phosphate). In this work, we have focused on FLIP166. Sequencing of the FLIP166 genome led to the identification of  $PmtC^{P282L}$  as the mutant form responsible for the FLIP phenotype. Also, transformation of FLIP166 protoplasts with a genomic library based on the pRG3-AMA-NotI self-replicating plasmid [22] identified SocA as a multicopy suppressor of the FLIP166 phenotype. Here, we present the functional characterization of the putative transcription factor SocA and the characterization of the  $PmtC^{P282L}$  mutation. The developed mutagenesis procedure will lead to the future identification of additional genes related to asexual development and to the updating of the molecular models of this process.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Oligonucleotides, Strains, and Culture Conditions

Strains of *A. nidulans* used in this study are listed in Table S1, while oligonucleotides used in the generation of transformation constructs or sequencing experiments are listed in Table S2. The strains were cultivated in either liquid or solid *Aspergillus* minimal (AMM) or complete (ACM) media, adequately supplemented for their respective auxotrophies [23,24]. Glucose (2%) and ammonium tartrate (5 mM) were used by default as sources of carbon and nitrogen, respectively. Nutrient depletion experiments were conducted by diluting the amount of carbon or nitrogen to one-fifth of the original concentration. To evaluate the phenotype of strains under stress conditions,  $NaH_2PO_4$  (0.5–1.25 M, initially; 0.65 M thereafter), sucrose (1.0 M), KCl (0.6 M) plus MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, 0.05 M),  $MgCl_2$  (0.18 M), or  $H_2O_2$  (6 mM) were added [17,21]. To analyze the effect of low pH on the phenotype of strains, HCl was used to acidify AMM to 4.23, which is the same pH value of AMM as when 0.65 M  $NaH_2PO_4$  is added.



A medium containing 25 g/L corn steep liquor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and sucrose (0.09 M) as the carbon source was used as the fermentation medium (AFM) to culture samples for protein extraction [25]. Transformed protoplasts were cultured on selective (lacking uridine and uracil) regeneration medium (RMM: AMM supplemented with 1 M sucrose). Mycelia for DNA extraction and Southern-blot analysis were cultured in liquid AMM. A phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1) mix was used for DNA separation, and the procedures described by us previously were followed [26]. For fluorescence microscopy analyses, conidiospores were incubated for approximately 18 h at room temperature in Ibidi  $\mu$ -Dishes containing 300  $\mu$ L of supplemented watch minimal medium (WMM) [27].

Conidia production was quantified as the average of 3–6 replicates per strain. Conidia produced by 72-hour-old colonies were collected in Tween 20 (0.02%). A Thoma cell counter was used to determine the total amount of conidia, which was divided by the area of the colony. The two-tailed Student's t test for unpaired samples (GraphPad Prism, version 8.0.1, San Diego, CA, USA) was used to determine statistically significant differences in conidia production between the reference strain and mutants. The corresponding column bar graph was drawn using GraphPad Prism.

To characterize, compared to the reference strain, the germination defects of a strain expressing SocA driven by the constitutive *gpdA<sup>mini</sup>* promoter [28], *gpdA<sup>P</sup>*,  $10^6$  To characterize, compared to the reference strain, the germination defects of a strain expressing SocA driven by the constitutive *gpdA<sup>mini</sup>* promoter [28], *gpdA<sup>P</sup>*,  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  were inoculated in Erlenmeyer flasks filled with liquid AMM. Conidia of each strain were incubated at 37 °C and 200 rpm. Samples were analyzed after 6, 8, 10, and 12 h of culture by counting the number of germinated conidia with one or two germ-tubes (from a minimum number of 250 conidia of each strain and time point). Two replicates were analyzed per strain. GraphPad Prism was used to draw the corresponding graph.

$\text{ml}^{-1}$  were inoculated in Erlenmeyer flasks filled with liquid AMM. Conidia of each strain were incubated at 37 °C and 200 rpm. Samples were analyzed after 6, 8, 10, and 12 h of culture by counting the number of germinated conidia with one or two germ-tubes (from a minimum number of 250 conidia of each strain and time point). Two replicates were analyzed per strain. GraphPad Prism was used to draw the corresponding graph.

DNA constructs for transformation were generated by the fusion-PCR technique [29]. For 3'-end gene tagging (wild-type or mutant versions), (1) approximately 1.5 Kb of the 3'-end of the coding region (oligonucleotides GSP1 and GSP2; Table S2), (2) a second fragment containing the tag (*gfp* or *ha<sub>3x</sub>*) plus the selection marker (*pyrG<sup>Afum</sup>* of *A. fumigatus*; oligonucleotides GFP1 and GFP2), and (3) 1.5 Kb of the 3'-UTR region of the gene (oligonucleotides GSP3 and GSP4) were amplified and subsequently fused. For gene deletion, the same procedure was followed with (1) approximately 1.5 Kb of the promoter region of the gene (oligonucleotides PP1 and PP2), (2) the selection marker (SMP1 and GFP2), and (3) 1.5 Kb of the 3'-UTR region of the gene (GSP3 and GSP4). To generate strains expressing *gpdA<sup>P</sup>*-driven SocA::GFP or SocA::HA<sub>3x</sub> chimeras, five fragments were amplified and fused essentially as described by us previously [14]: (1) 1.5 Kb of the promoter (oligonucleotides PP1 and PP2'-ATG), (2) *gpdA<sup>P</sup>* (*gpdAU<sub>P</sub>* and *gpdAD<sub>w</sub>*), (3) the coding region of *socA* (*geneSP* and GSP2), (4) *gfp* or *ha<sub>3x</sub>* plus *pyrG<sup>Afum</sup>* (GFP1 and GFP2), and (5) 1.5 Kb of the 3'-UTR region (GSP3 and GSP4). Generation and transformation of protoplasts of recipient strains was done as described by Tilburn and colleagues as well as Szewczyk and colleagues [30,31].

Meiotic crosses were carried out essentially as described by Todd et al. [32]. Diploids were generated by inoculating on selective AMM conidia of the corresponding heterokaryons [33] or by culturing on selective RMM a mix of protoplasts of the parental strains. Haploidization of diploids was induced by adding benomyl (1–3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to the culture medium [34].

## 2.2. Mutagenesis Procedure

To mutagenize  $\Delta\textit{flbB}$  conidia, these were collected from colonies previously cultured for 96 h at 37 °C on AMM supplemented with 0.65 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Approximately 1250 conidia were inoculated on Petri plates of 14-cm diameter filled with the same culture medium. Conidia (all plates but one,

which was used as control) were subjected to 254-nm UV radiation using a Mineralight Lamp (Model UVGL-58 lamp; intensity: 1350  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). Exposure times were selected to cause a survival rate of 5–10%, usually 80–100 s [17,26]. Plates were cultured at 37 °C for 72 h, and mutants unable to conidiate were transferred to 5.5-cm plates filled with AMM plus 0.65 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  before phenotypic characterization.

### 2.3. Cloning of *socA*

*An8501/socA* was cloned after transformation of FLIP166 protoplasts with a sample of a wild-type gene library cloned in the self-replicating plasmid pRG3-AMA-NotI [22]. Revertants were identified as conidiating colonies, which were grown to isolate genomic DNA plus the corresponding plasmids by transformation in *E. coli*. Purified plasmids were tested for complementation of the FLIP166 aconidial phenotype, and oligonucleotides pRG3Up and pRG3Dw were used to sequence flanking regions of inserts. These sequences were used to delimit the full genomic sequence in the insert by comparison with the *A. nidulans* genome database.

### 2.4. Bioinformatics

The Integrative Genomics Viewer (IGV; [35]) was used to visualize DNA- and RNA-seq reads and to correct the predicted coding sequence of *socA*. Prediction of the presence of functional domains in protein sequences was done using InterPro [36]. Query sequences were BLASTed using NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) or EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) websites. Clustal omega was used for sequence alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) while the open software Genedoc (version 2.7.000) was selected for their visualization. Phylogenetic trees were constructed with MegaX (version 7.0) [37] and the neighbor-joining method, with a minimum bootstrap of 1000 replicates. The trees were edited using iTOL (Interactive Tree of Life, version 5.2) [38]. To build a structure homology model for PmtC, Swiss Model [39] and Phyre2 (version 2.0) [40] servers were used. Finally, DynaMut was used to assess the impact of specific mutations on protein conformation [41].

### 2.5. Fluorescence Microscopy

Subcellular localization of SocA and PmtC was analyzed using a Leica DMI-6000b inverted microscope following our standard procedures [14,15]. The microscope is equipped with a 63  $\times$  Plan Apo 1.4 N.A. oil immersion lens from Leica, and a GFP filter (excitation at 470 nm and emission at 525 nm). ImageJ was used to process fluorescence microscopy and phase contrast images (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (US. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

### 2.6. Protein Extraction and Immunodetection

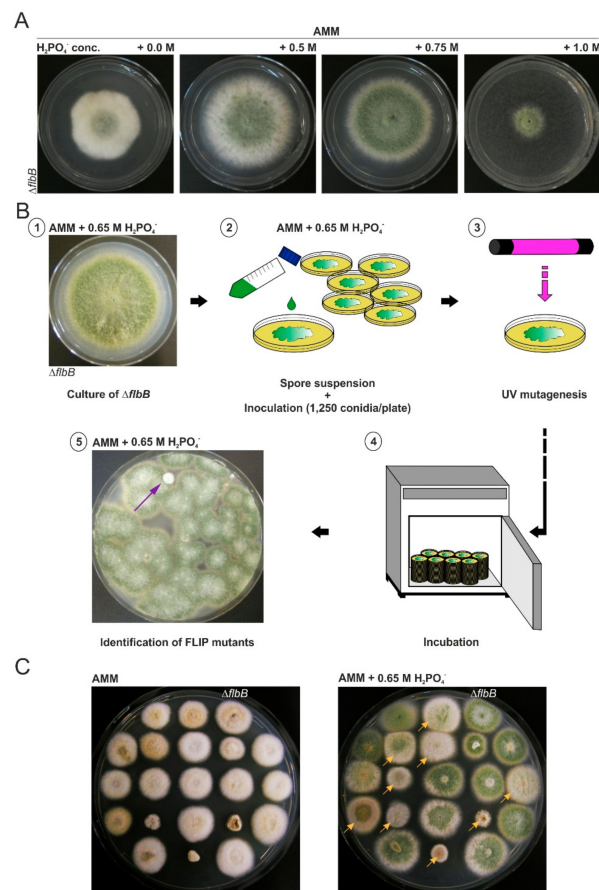
Mycelial samples of strains expressing the chimera SocA::GFP were grown by default in AFM for 15 h at 37 °C and 200 rpm. To analyze the effect of phosphate,  $10^6$  conidia/mL were inoculated in Erlenmeyer flasks filled with 25 mL of liquid AFM, cultured for 15 h at 37 °C and 200 rpm, filtered, and transferred to AMM supplemented with 0.65 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Samples for protein extraction were collected after 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, and 240 min of culture and lyophilized.

For total protein extraction, we followed the protocol described by Hervás-Aguilar and Peñalva [42]. Cell lysis was carried out in 1 mL of alkaline lysis buffer (0.2 M NaOH and 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol), and proteins were precipitated by adding 10% trichloroacetic acid (TCA). Samples were centrifuged, and the supernatant was discarded. Pellets were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  Tris-Base (1 M) and 200  $\mu\text{L}$  of SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH = 6.8, 2% SDS (*p/v*), 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (*v/v*), 6 M urea, and 0.05% bromophenol blue (*p/v*)). Aliquots of 10  $\mu\text{L}$  were then loaded and separated in 10% polyacrylamide gels [43] before transference to nitrocellulose filters. For the immunodetection of SocA::GFP, an  $\alpha$ -GFP (mouse) monoclonal antibody cocktail (1:5000 Roche) was used. Peroxidase-conjugated  $\alpha$ -mouse (1:4000, Jackson Immuno Research Laboratories) was used as secondary antibody. The Amersham Biosciences ECL kit was used to induce peroxidase activity, and chemiluminescence was detected using a Chemidoc + XRS system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Isolation of FLIP (Fluffy in Phosphate) Mutants

Null and loss-of-function *flbB*<sup>-</sup> colonies display a characteristic *fluffy* aconidial phenotype on AMM (Figure 1A; left). This aconidial phenotype can be reverted, nonetheless, by culturing on AMM supplemented with an elevated concentration of sodium phosphate, specifically NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. To identify additional genes related to the control of conidiation in *A. nidulans* and/or genes potentially involved in a pathway inducing asexual development in response to high phosphate concentrations, we mutagenized  $\Delta flbB$  conidia and isolated mutants unable to conidiate on AMM containing 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 1B). Short-wave (254 nm) UV mutagenesis was carried out as indicated in the Materials and Methods section using exposure times allowing only 5–10% of  $\Delta flbB$  conidia to survive (Figure 1B). Among 11,000 survivors, eighty mutants showing a FLIP phenotype were selected. Their aconidial phenotypes were compared to that of the null *flbB* parental strain on AMM and AMM plus 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Figure 1C shows a selection of FLIP mutants which displayed different conidiation and/or colonial growth deficiencies.



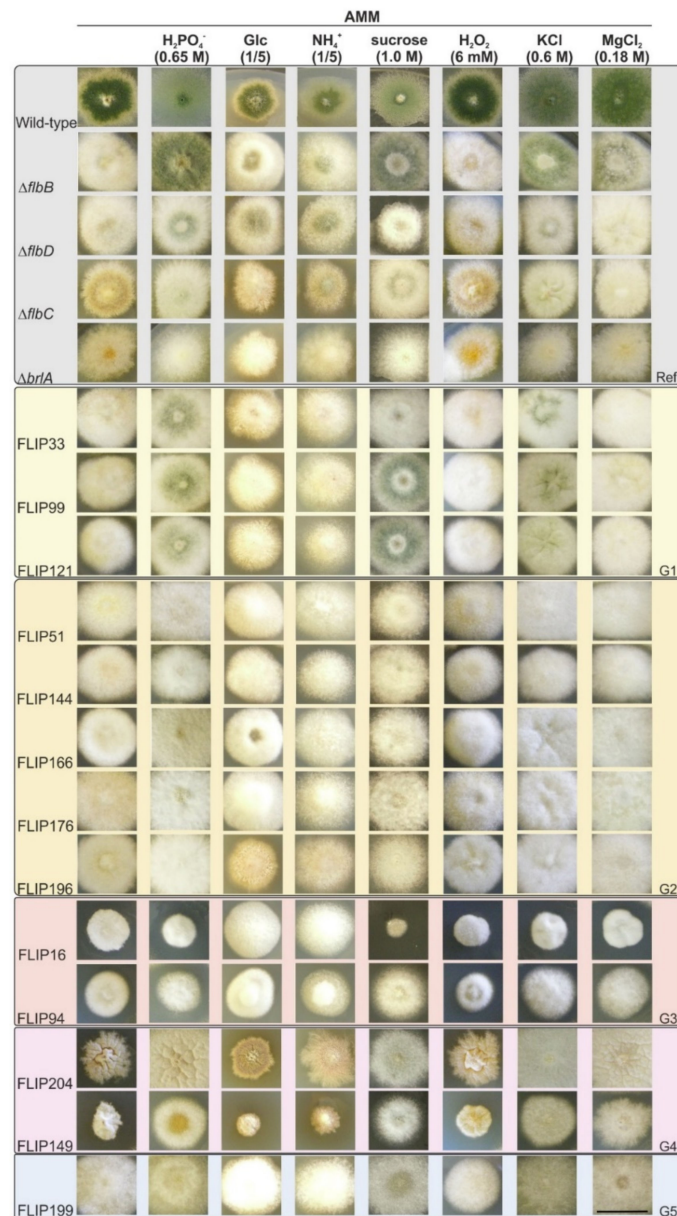
**Figure 1.** Mutagenesis procedure followed to isolate FLIP (Fluffy in Phosphate) mutants: (A) Phenotype of the parental  $\Delta flbB$  strain on *Aspergillus* minimal medium (AMM) supplemented with increasing concentrations of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Petri dishes (diameter: 5.5 cm) were cultured at 37 °C for 72 h. A concentration of 0.65 M was established. (B) Mutagenesis procedure followed for the isolation of FLIP mutants:  $\Delta flbB$  conidia were collected and inoculated (1250 conidia/plate; diameter: 14 cm) on AMM dishes supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Conidia (all plates but one, which was used as negative control) were mutagenized by using UV radiation of 254 nm and exposure times of 80–100 s. After 72 h of culture at 37 °C, mutants unable to conidiate were transferred to 5.5-cm dishes filled with AMM plus 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> before phenotypic characterization. (C) Growth and conidiation phenotypes of a group of FLIP mutants in AMM and AMM plus 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> compared to the parental null *flbB* strain and after 72 h of incubation at 37 °C (diameter of Petri dishes: 9 cm). The arrows designate FLIP mutants with different phenotypes (see also Figure 2).

### 3.2. Phenotypic Characterization of FLIP Mutants

First, we considered the possibility of FLIP strains carrying mutations in previously characterized regulators of asexual development. With this aim, we compared growth on solid AMM and AMM plus 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> of a set of FLIP mutants representative of the different phenotypic groups to strains carrying null alleles of genes coding for UDA regulators and also the  $\Delta brlA$  strain (Figure S1A). As a result, potential mutations in UDA genes *flbC*, *flbE*, *tmpA*, *tmpB*, and *fluG* were discarded for the FLIP mutants. The  $\Delta flbC$  strain produced on AMM abundant Hülle cells after 72 h of culture. The  $\Delta tmpA$  and  $\Delta tmpB$  strains conidiated profusely in both media. Finally, the  $\Delta flbE$  and  $\Delta fluG$  strains conidiated on AMM supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Although, as expected, the  $\Delta brlA$  strain showed a severe aconidial phenotype under phosphate stress, it was also discarded after a detailed microscopic analysis (not shown). Similarities were observed when comparing FLIP mutants with a  $\Delta flbD$  strain and the double null mutant  $\Delta flbB;\Delta flbD$  (see mutants FLIP121 and FLIP196 in Figure S1A). The transformation of protoplasts of FLIP121 and an additional two FLIP mutants with similar phenotypes (FLIP33 and FLIP104) with an *flbD::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* construct did not restore a  $\Delta flbB$  phenotype on AMM medium with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure S1B). Thus, we ruled out the possibility of these three mutants being double loss-of-function  $\Delta flbB;flbD^-$  mutants.

Second, we classified the 80 FLIP mutants into groups according to their main phenotypic traits. Hence, in addition to AMM and AMM plus 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, the effect of carbon or nitrogen limitation (one-fifth of the quantity added to standard AMM) and the addition of sucrose (1.0 M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM), KCl (0.6 M; buffered at pH 6.5 with 0.05 M MES), or MgCl<sub>2</sub> (0.18 M) were analyzed. Again, the parental  $\Delta flbB$  mutant and the  $\Delta flbC$ ,  $\Delta flbD$ , and  $\Delta brlA$  strains were used as references. Six phenotypic groups were differentiated among FLIP mutants (Figure 2). The first one (20 mutants out of 80; 25%) included those showing a  $\Delta flbD$ -like phenotype on AMM with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, which produced conidia in the center of the colony (FLIP33, FLIP99, and FLIP121 in Figure 2; note the phenotypic differences among these three mutants and compared to a  $\Delta flbD$  strain on AMM with 1.0 M sucrose; see also Figure S2). The second group included FLIP mutants with a clearly aconidial phenotype on AMM with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (19 out of 80; 23.8%; i.e., FLIP51, FLIP144, FLIP166, FLIP176, and FLIP196 in Figure 2). The third group comprised FLIP mutants showing a reduced colony diameter (18 out of 80; 22.5%; i.e., FLIP16 and FLIP94). Mutants in group 4 displayed a reduced-radial growth phenotype that was reverted under specific culture conditions (5 out of 80; 6.3%; see, for example, FLIP149 and mainly FLIP204 on medium with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Those FLIP mutants with a wet, purportedly autolytic, phenotype in the center of the colony were included into the fifth group (8 mutants out of 80; 10%; see, for example, FLIP199 in AMM with KCl/MES). Finally, the sixth group included the rest of FLIP mutants which could not be included in any of the five groups described above (10 out of 80; 12.5%; not shown).

The addition of high concentrations of H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> caused a decrease in the pH of the extracellular medium. To evaluate an effect of medium acidification on the phenotypes scored, FLIP mutants were cultured on AMM adjusted to pH 4.23 with HCl (Figure S3). For most FLIP mutants and the parental  $\Delta flbB$  strain, results suggested that the phenotype observed in AMM with 0.65M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was not caused exclusively by the acidification of the culture medium.



**Figure 2.** Phenotypic classification of FLIP mutants: Phenotype of specific FLIP mutants after 72 h of culture at 37 °C on AMM, on AMM supplemented with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.65 M), sucrose (1.0 M), KCl (0.6 M) plus MES (0.05 M), MgCl<sub>2</sub> (0.18 M), or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM), as well as on AMM in which carbon or nitrogen sources were diluted to one-fifth of the original concentration. The different FLIP phenotypes were compared to reference strains with a wild-type or aconidial (parental *ΔflbB*; *ΔflbD*, *ΔflbC*, and *ΔbrlA*) phenotypes. Five (G1–5) out of the six phenotypic groups are shown: G1—FLIP mutants with a *ΔflbD*-like phenotype on AMM with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (FLIP33, FLIP99, and FLIP121 are shown; see also Figure S2); G2—FLIP mutants with a clearly aconidial phenotype on AMM with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (i.e., FLIP51, FLIP144, FLIP166, FLIP176, and FLIP196); G3—FLIP mutants showing a reduced colony diameter (i.e., FLIP16 and FLIP94); G4—FLIP mutants with a reduced growth phenotype that can be reverted under specific culture conditions (FLIP204 and FLIP149); and G5—FLIP mutants with a wet, purportedly autolytic, phenotype in the center of the colony under specific culture conditions (FLIP199). Group G6 corresponds to those FLIP mutants not included in any of the previous five categories (not shown). Scale bar = 2 cm.

### 3.3. *An8501/socA* as a Multicopy Suppressor of the FLIP166 Phenotype: Functional Characterization

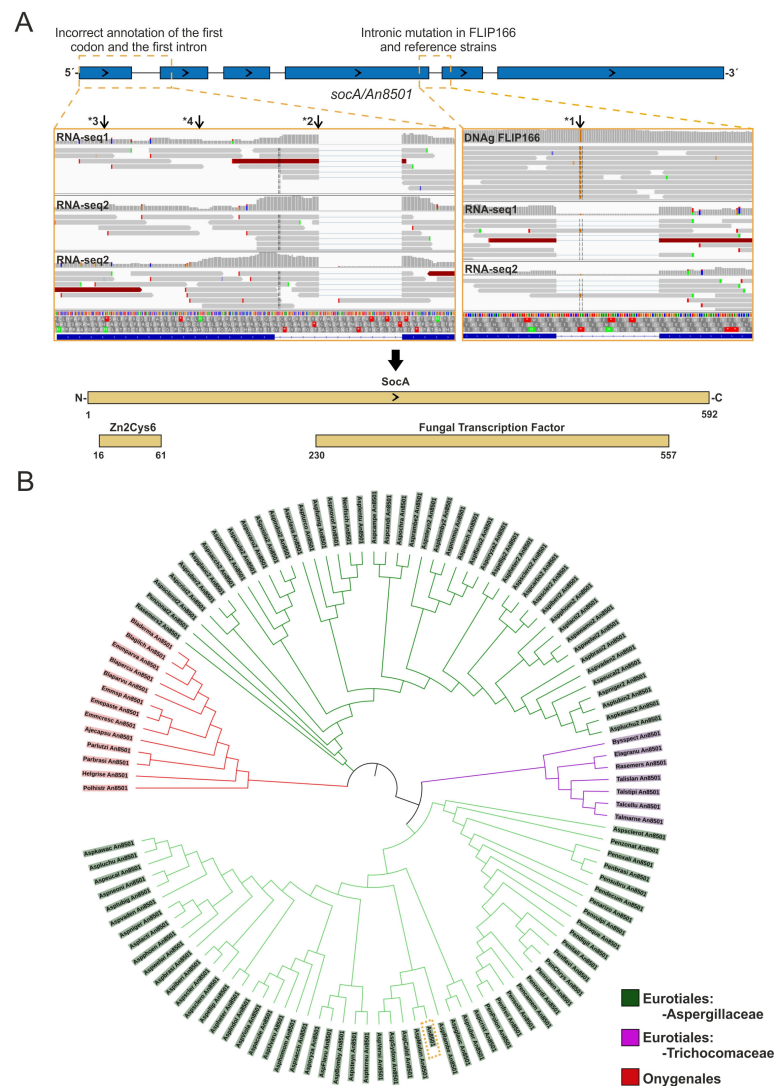
To investigate dominance of FLIP mutations, diploid strains were generated between specific FLIP mutants and strain RMSO11 (see Table S1; see also Figure S4A). Benomyl haploidization confirmed the diploid nature of the strains generated, while their wild-type phenotype confirmed the recessive nature of the mutations causing the FLIP phenotype of mutants 16 and 166.

Transformation of FLIP166 protoplasts with a wild-type pRG3-AMA-NotI library led to the isolation of transformants that were able to conidiate on selective culture medium supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure S4B). Plasmids causing the phenotypic reversion were recovered, and their inserts were sequenced, leading to the identification of *An8501*. As expected, due to the use of a wild-type library, plasmids bearing a copy of *flbB* were also recovered (see below). Sequencing of *An8501* led to the identification of a single nucleotide polymorphism in the fourth predicted intron (Figure 3A) [44]. Thus, we concluded that *An8501* is a multicopy suppressor of the FLIP166 phenotype and consequently named it *socA* (suppressor of the FLIP conidiation phenotype). An incorrect annotation of the coding region of *socA* was also noticed (Figure 3A), since RNAseq reads clearly showed that the first intron is shorter in 5'. This made us modify the prediction for the first exon and intron, adding in the former codons for amino acids that are important for the prediction of the functional domains of SocA.

Detection of a Zn<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub> binuclear zinc cluster (IPR001138) in the N-terminus and a Fungal transcriptional regulatory domain (IPR021858) in the C-terminal half of SocA (Figure 3A) strongly supports a regulatory role for SocA. BLAST analyses using as query the corrected sequence of SocA identified putative orthologs in Eurotiales and Onygenales orders within the class of Eurotiomycetes (Figure 3B). Interestingly, the proteomes of multiple Aspergillaceae species (with exceptions such as, for example, *A. nidulans* itself) included two paralogs of SocA, which were mapped to different clades of our tree. Overall, phylogenetic analyses suggest that SocA emerged within Eurotiomycetes and that its evolutionary history included at least one duplication event.

A functional characterization of SocA was done to investigate its role as a regulator of conidiation. Strains carrying the null *socA* allele and strains expressing SocA::GFP driven either by the native or the constitutive *gpdA<sup>P</sup>* promoter were generated, each of them in both wild-type and  $\Delta flbB$  backgrounds (Figure 4A). The pattern of conidiation was unaltered in  $\Delta socA$  and SocA::GFP strains in the wild-type *flbB* background. Significant differences were observed, however, in the  $\Delta flbB$  background on AMM supplemented with 0.65 M of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. After 48 h of culture, conidia production by the double-null  $\Delta flbB$ ;  $\Delta socA$  strain decreased compared to the parental  $\Delta flbB$  strain, from  $5.54 \times 10^6 \pm 0.22 \times 10^6$  to  $0.53 \times 10^6 \pm 0.19 \times 10^6$  conidia/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ , significant change;  $n = 6$  for each strain; Figure 4B). The  $\Delta flbB$ ; *socA*::*gfp* strain showed an intermediate phenotype compared to the double null and the parental  $\Delta flbB$  mutants, although conidia quantification showed a statistically nonsignificant change in asexual spore production compared to the null *flbB* strain ( $5.63 \times 10^6 \pm 0.47 \times 10^6$  conidia/cm<sup>2</sup>;  $p = 0.84$ ;  $n = 3$ ).

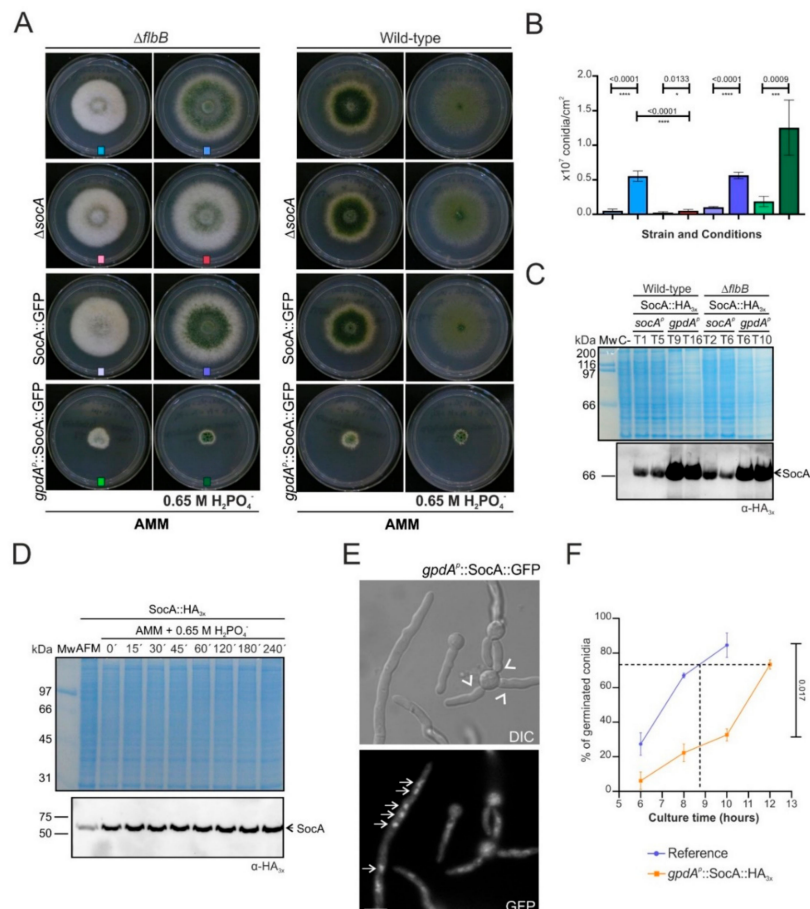
Constitutive and higher expression of SocA::GFP driven by the *gpdA<sup>P</sup>* promoter was confirmed through immunodetection in Figure 4C (the Coomassie-stained gel is shown as a control of equal loading of the protein samples). This caused a strong inhibition of radial growth in all conditions and backgrounds tested (Figure 4A), suggesting that misscheduled and elevated levels of SocA probably have detrimental effects on colony growth. Additional immunodetection experiments using protein extracts of mycelial samples grown in liquid medium supplemented with 0.65 M of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> suggested that *socA* expression is not induced under these stress conditions (Figure 4D).



**Figure 3.** Analysis of *socA* sequence and protein evolution: **(A)** Sequence analysis of *An8501/socA*. The predictions of the intronic and exonic regions done by the AspGD *Aspergillus* genome (<http://www.aspgd.org/>) and FungiDB databases (<https://fungidb.org/fungidb/>) (top) are compared to DNA-seq (FLIP166) and RNA-seq (*ΔflbB* and a wild-type reference) experiments (middle). On the one hand, the right panel shows that the intronic mutation identified in FLIP166 in the fourth intron of *socA* was also present in the RNA-seq reads mapping to this intron in the reference strains (arrow \*1), suggesting that it is not responsible for the FLIP166 phenotype. On the other hand, the left panel shows that the initiation codon (arrow \*3) and the first intron were incorrectly annotated. Arrow \*2 indicates the end of the first exon, and arrow \*4 indicates the correct initiation codon. The bottom panel shows the prediction of the functional domains done by the InterPro website for the corrected amino acid sequence of SocA, which includes two transcriptional regulatory domains. **(B)** Phylogenetic tree of SocA orthologs: The tree was built using MegaX (neighbor-joining method and 2500 replicates) and edited using iTOL. Red color designates SocA orthologs of species of the order Onygenales, while green and purple differentiate SocA orthologs of Aspergillaceae or Trichocomaceae species within Eurotiales, respectively. The dotted orange square marks the position of An8501/SocA in the tree. Note that the evolution of SocA includes a duplication event in specific *Aspergilli* and *Penicilli*.

As expected for a putative transcription factor, fluorescence microscopy analyses showed a nuclear localization of the *gpdA<sup>P</sup>*-driven SocA::GFP chimera (Figure 4E). These analyses also revealed an altered germination pattern in this strain (arrowheads in Figure 4E), suggesting that the reduced radial growth phenotype caused by constitutive expression of *socA* was probably a consequence of a delayed germination

and an altered polarity establishment. The graph in Figure 4F confirms that germination in this strain is delayed (see the dotted line). For example, while the *gpdA<sup>P</sup>*-driven SocA::HA<sub>3x</sub> strain needs 12 h to achieve a 73% germinated conidia, the reference strain would need less than 9 h (n = 2 measurements per strain).

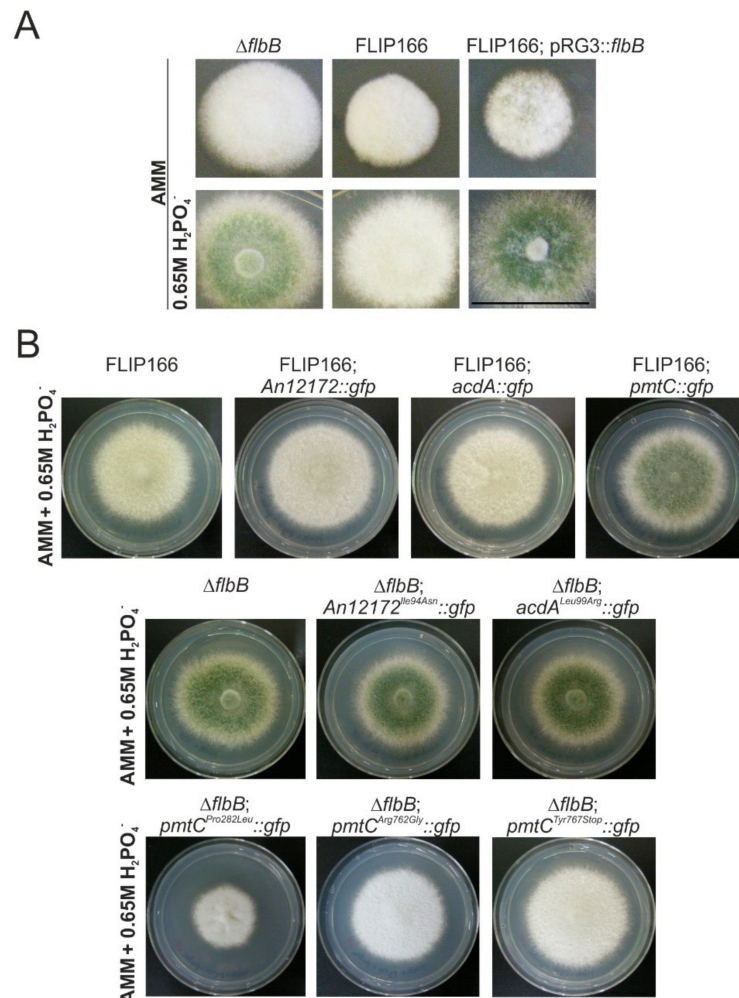


**Figure 4.** Functional characterization of SocA: (A) Phenotypes of  $\Delta socA$ , SocA::GFP, and *gpdA<sup>P</sup>*::SocA::GFP strains, all in both  $\Delta flbB$  (left) and wild-type (right) backgrounds, after 72 h of culture at 37 °C on AMM and AMM plus 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (diameter of Petri dishes: 5.5 cm): The color code is the same as that used in Figure 4B. (B) Quantification of conidia production by the  $\Delta flbB$  strains shown in panel A (bar colors keyed to photos): Values are given as the mean of at least three replicates plus SD. *p* values are given, and statistically significant (*p* < 0.05) relations are indicated with a variable number of asterisks (\* *p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001). Double deletion of *flbB* and *socA* significantly decreases conidia production in AMM supplemented with H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (C) Immunodetection of SocA::HA<sub>3x</sub>, driven either by native or *gpdA<sup>P</sup>* promoters, both in wild-type and  $\Delta flbB$  backgrounds: Two clones per strains are shown. The Coomassie-stained gel is shown as a loading control. Driving expression through *gpdA<sup>P</sup>* clearly increases SocA levels. (D) Immunodetection of SocA::HA<sub>3x</sub> (driven by the native promoter and in the wild-type *flbB* background) in mycelial samples collected after 15 h of culture in AFM and 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, and 240 min after the transference of mycelia to AMM supplemented with H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. The Coomassie-stained gel is shown as a loading control. Addition of 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> to the culture medium does not increase SocA levels. (E) Subcellular localization of *gpdA<sup>P</sup>*-driven SocA::GFP in germlings: The micrograph shows the altered germination pattern of the conidia (arrowheads), while fluorescence microscopy shows the nuclear localization of the putative transcriptional regulator (arrows). Scale bar = 5 μm. (F) Variation of the percentage of germinated conidia with the time of culture in liquid medium: Values of the *gpdA<sup>P</sup>*::SocA::HA<sub>3x</sub> strain (orange line) are compared to a wild-type reference (purple line) and are given as the mean of two replicates plus SD. The dotted line shows that, in order to achieve the level of germination of the reference, the strain constitutively expressing SocA::HA<sub>3x</sub> is delayed approximately three hours.



### 3.4. The Mutant Form Pro282Leu of the Protein O-Mannosyltransferase *PmtC* Is Responsible for the FLIP166 Phenotype

Transformation of FLIP166 protoplasts with a pRG3::*flbB* plasmid isolated from the wild-type library showed that the unknown mutation in the FLIP166 mutant caused an aconidial phenotype on AMM and that this aconidial phenotype was reverted on AMM supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 5A). This observation suggested that the gene mutated in FLIP166 is not a member of a hypothetical pathway signaling conidiation exclusively in response to phosphate stress and that the FLIP166 phenotype is an additive effect of *flbB* deletion and the unknown mutation.



**Figure 5.** Identification of *pmtC* as the mutated gene responsible for the FLIP166 phenotype: (A) Phenotype of strains  $\Delta flbB$ , FLIP166, and FLIP166 transformed with a pRG3::*flbB* plasmid after 48 h of culture on AMM (top row) and AMM supplemented with 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (bottom row). Scale bar = 2 cm. The aconidial phenotype of FLIP166 under phosphate stress conditions is the result of the addition of the effect of *flbB* deletion and the unknown mutation. (B) Phenotypes of FLIP166 and FLIP166 transformed with *An12172::gfp*, *acdA::gfp* or *pmtC::gfp* constructs (row 1) or  $\Delta flbB$  and  $\Delta flbB$  transformed with the mutant versions of the abovementioned constructs (rows 2 and 3) after 72 h of culture on AMM supplemented with 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Diameter of Petri dishes: 5.5 cm. Expression of a wild-type *pmtC* form suppresses the FLIP166 phenotype, while the insertion of a mutant *pmtC<sup>Pro282Leu</sup>* form in the null *flbB* background causes a FLIP phenotype with reduced growth. The two additional mutants of *pmtC* isolated ( $\Delta flbB$  background), Arg762Gly and Tyr767Stop, show an aconidial phenotype on AMM supplemented with 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

As a first approach to its identification, we sequenced the genome of the FLIP166 mutant (Stabvida; Caparica, Portugal) and focused the analysis on exonic mutations compared to 1) the FGSCA4 genome,

used as the reference in the IGV software; 2) RNAseq reads of a  $\Delta flbB$  strain and its isogenic wild-type strain [44,45]; and 3) RNAseq reads of a  $\Delta sltA$  strain and its reference wild-type strain (E.A. Espeso, unpublished). Up to ten candidate exonic mutations were identified in FLIP166 genomic sequence compared to the genomes of reference strains and transcriptomic data (File S1). Seven of these candidate mutations were sequenced in FLIP166 and the parental  $\Delta flbB$  strain. Only the hypothetical mutation in An6835 was discarded, while the rest were confirmed as bona fide single nucleotide variations (SNVs) in the FLIP mutant.

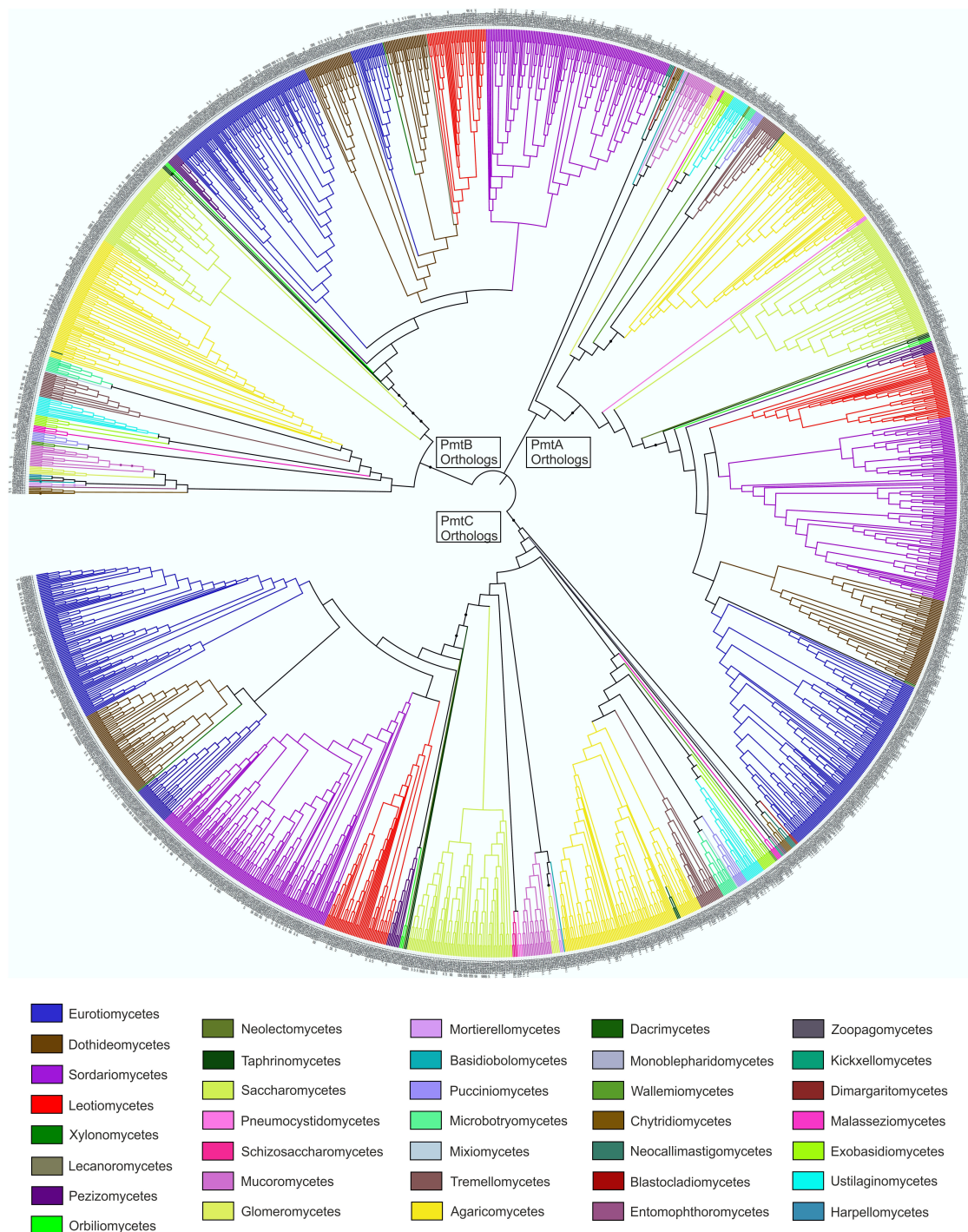
To delimit the list of candidates, meiotic crosses of FLIP166 were carried out and diploids were generated with the master strains FGSCA68 and FGSCA283 (Table S1). The wild-type phenotype of the diploid strains confirmed again that the mutation responsible for the FLIP166 phenotype is recessive, while an analysis of the meiotic progeny, on the one hand, and the haploids isolated using benomyl, on the other hand, focused our search on chromosome VII (not shown). Since we obtained in meiotic analyses a high percentage (>85%) of acriflavine sensitive colonies, we also took chromosome II into consideration. Thus, the search was limited to three candidate mutations in the following genes (File S1): (1) an ATT (Ile) to AAT (Asn) point substitution in codon 94 of *An12172* (Chr II), coding for a putative LCCL domain-containing transmembrane protein; (2) a CTG (Leu) to CGG (Arg) point mutation in codon 99 of *An12335/acdA* (Chr VII), coding for a peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase [46]; and (3) a CCG (Pro) to CTG (Leu) point mutation in codon 282 of *An1459/pmtC* (Chr VII), coding for a protein O-mannosyltransferase involved in hyphal growth and conidia formation [47–49].

DNA constructs consisting of *gfp*-tagged wild-type versions of each of the three genes were used in transformations to determine which SNVs in FLIP166 were responsible for its phenotype. Only the targeted insertion of the *pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* construct at its native *locus* caused the reversion of the FLIP166 phenotype on AMM supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 5B). Reversely, replacement of wild-type *pmtC locus* in the parental  $\Delta flbB$  strain with the *pmtC<sup>Pro282Leu</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* construct caused an aconidial phenotype on AMM with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, similar to that observed in FLIP166. Such an aconidial phenotype was not observed when this parental strain was transformed with *An12172<sup>Ile94Asn</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* or *acdA<sup>Leu99Arg</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* constructs (Figure 5B). Overall, our results show that the *pmtC<sup>Pro282Leu</sup>* mutation is responsible for the aconidial FLIP166 phenotype on AMM supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Nevertheless, we observed that the radial growth of FLIP166 was bigger than that of the  $\Delta flbB$  strain transformed with the *pmtC<sup>Pro282Leu</sup>::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* construct, suggesting that the presence of indeterminate mutations in FLIP166 may be also affecting radial growth.

Furthermore, in this set of transformations, we isolated two  $\Delta flbB$  strains that, in the absence of the mutation corresponding to the Pro282Leu substitution, presented other mutations in *pmtC*. One of them caused the Arg762Gly point substitution while the second one introduced a premature stop at position 767 (Tyr767Stop). Both mutations generated a FLIP aconidial phenotype on medium supplemented with 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 5B) but not an inhibition of radial extension at the level of the Pro282Leu mutation. These results strongly suggest that the C-terminal end of PmtC is necessary for the control of conidiation but may be less important in the control of growth.

### 3.5. Substitution of Proline in Position 282 of PmtC Causes an Aconidial Phenotype and an Inhibition of Growth but Not a Delocalization of the Protein

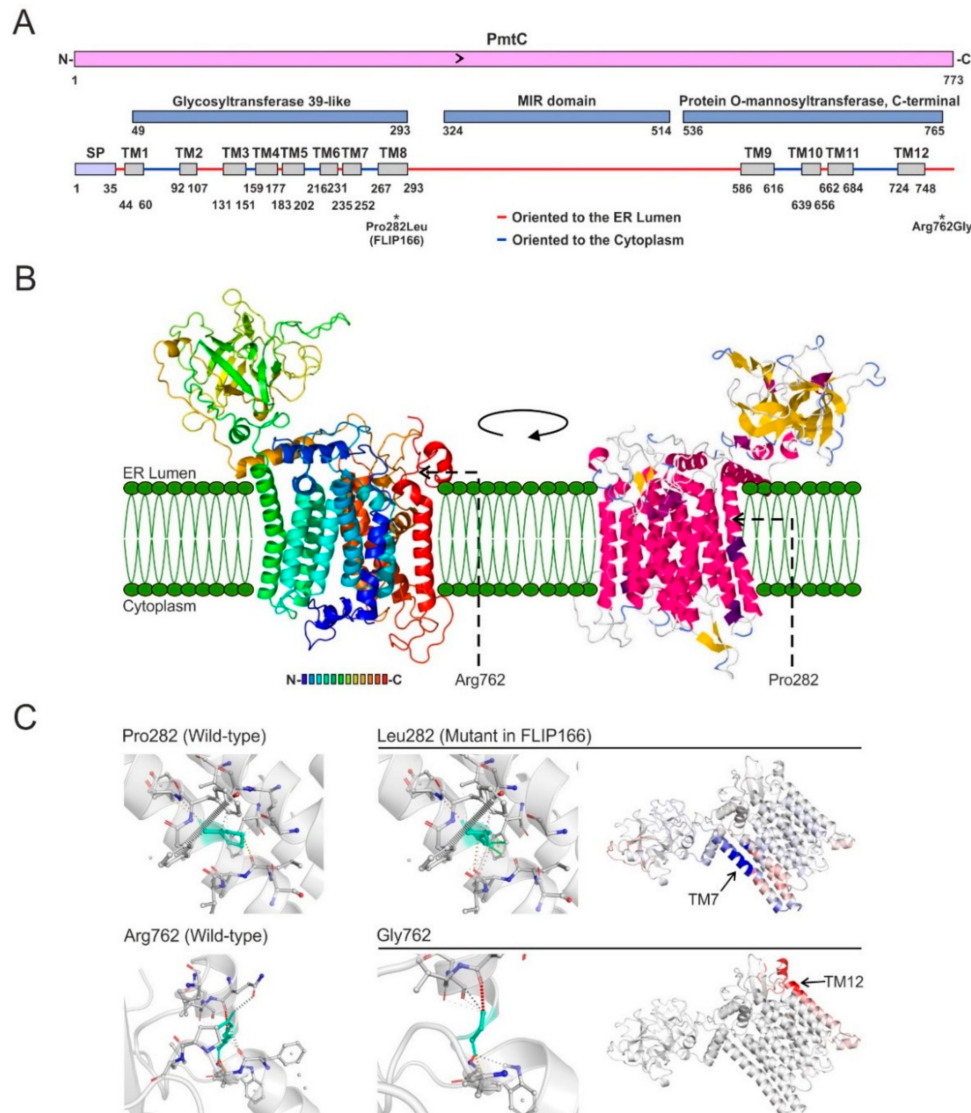
PmtC is a protein O-mannosyltransferase of the subfamily 4. Protein O-mannosyltransferases initiate glycosylation of proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by transferring a mannosyl residue from dolichyl-P-mannose to the hydroxyl group of Ser or Thr amino acids of target proteins [48,50,51]. Then, additional carbohydrate residues are added to this mannose in the Golgi apparatus. There are 3 protein O-mannosyltransferases in *A. nidulans*, all of them conserved in fungi and also outside the fungal kingdom [51]. Our phylogenetic tree, built with 2169 fungal orthologs of the three Pmt proteins of *A. nidulans*, represents most of the classes of the fungal tree of life (Figure 6) and suggests that all fungal classes have conserved the three Pmt orthologs, probably due to their central roles in posttranslational modification of proteins.



**Figure 6.** Evolutionary analysis of protein O-Mannosyltransferases of *A. nidulans*: Phylogenetic tree corresponding to 2169 fungal orthologs of *A. nidulans* PmtA/An5105, PmtB/AN4761, and PmtC/An1459. The tree was built using MegaX (neighbor-joining method and 1000 replicates) and edited using iTOL. The color key indicates the fungal class each ortholog belongs to. The clades corresponding to PmtA/B/C orthologs are indicated. Results suggest that the three protein O-mannosyltransferases are conserved in all fungal classes.

Our RNAseq results [44,45] confirmed the previous annotation of the coding region of *pmtC* in the AspGD and FungiDB databases. *pmtC* gene structure is shown in File S1. InterPro searches predicted the presence of three characteristic domains in PmtC (Figure 7A): First, a glycosyltransferase 39-like domain (IPR003342) between residues 49 and 293, which would be responsible for the mannosyltransferase

activity; second, an MIR domain (IPR016093) between residues 324 and 514, with three repetitions of the MIR motif which is predicted to form a closed  $\beta$ -barrel structure that may have a ligand transferase function; and finally, a protein O-mannosyltransferase C-terminal domain (IPR032421) between residues 536 and 765, which would add four transmembrane domains to the protein.



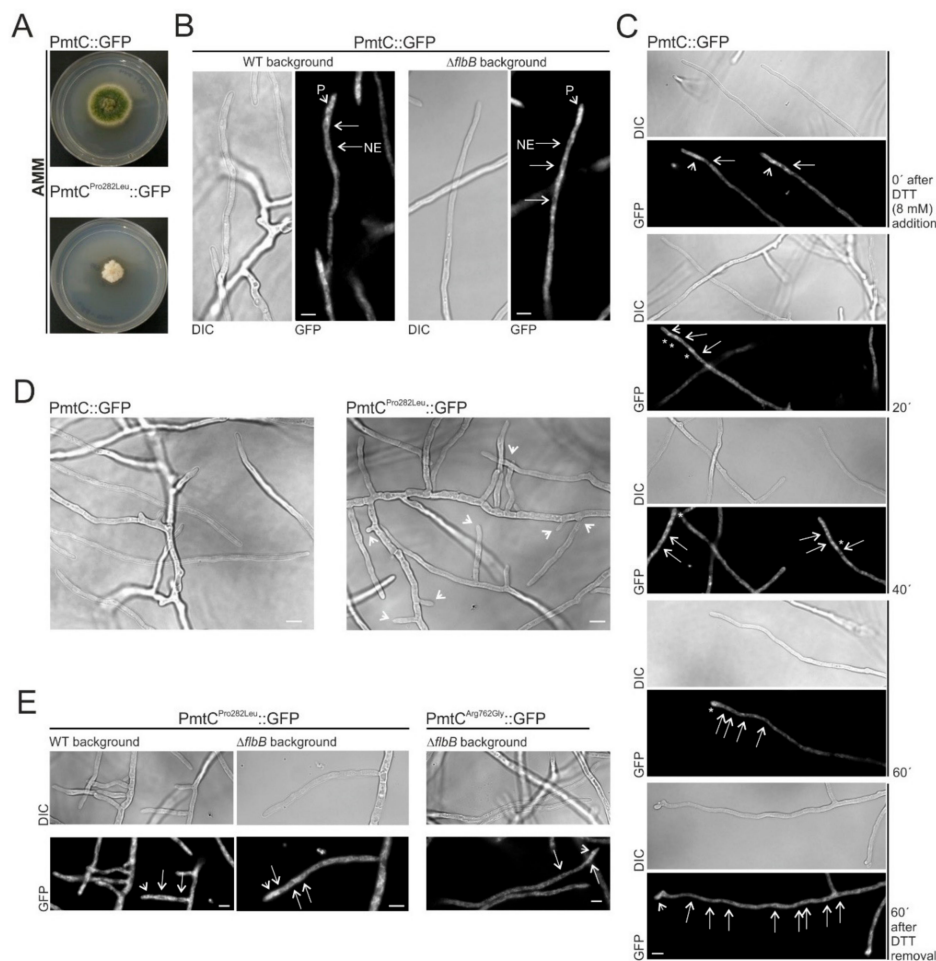
**Figure 7.** Domain organization and predicted structure of PmtC: (A) Domain analysis of PmtC based on InterPro and Phyre2. The extension of domains related to protein O-mannosyltransferase activity, as well as those of a signal peptide and the twelve transmembrane helices predicted are also indicated. Red and blue lines indicate orientation towards the ER lumen or the cytoplasm, respectively. (B) Prediction of the three-dimensional structure of PmtC carried out by Phyre2 and based on Protein Data Bank (PDB) entry 6P25. The rainbow-colored form on the left indicates the N- (blue) and C-terminal (red) ends of the protein, while the form on the right represents domains with secondary structure. The position of residues Pro282 (transmembrane, TM, helix 8) and Arg762 (C-terminus) are also indicated. (C) Assessment of the effect on interatomic interactions and protein stability of the Pro282 (left) to Leu (middle) substitution identified in the mutant FLIP166 (row 1) or the Arg762 (left) to Gly (middle) substitution identified in the transformation of the parental  $\Delta$ *flbB* strain (row 2): Blue and red colors in the pictures on the right represent a gain of rigidity (Pro282Leu) or flexibility (Arg762Gly), respectively. The analysis was carried out using the DynaMut website.

Protein structure homology-modeling of PmtC in SwissModel and Phyre2 servers [39,40] predicted the presence of eight transmembrane (TM) helices along the N-terminal glycosyltransferase domain plus the remaining four of the C-terminal end of the protein, totaling 12 membrane-pass helices (Figure 7A). The point mutation Pro282Leu was located within the eighth TM helix (see also the location of the Arg762Gly substitution in the C-terminus of the protein). Three-dimensional modeling of PmtC was based on Protein Data Bank (PDB) entry 6P25, and 96% of residues were modeled at a confidence higher than 90%. Results indicate that all TM helices group together in an  $\alpha$ -structure that would be inserted in the ER membrane while the  $\beta$ -barrel corresponding to the MIR domain would be oriented to the lumen of the ER (Figure 7A,B; see also Reference [51]). DynaMut [41] predicted that Pro282Leu substitution increases rigidity of the eighth TM helix of PmtC (stabilizing) as well as hydrophobic interactions of the mutant Leu residue with Phe248 (TM7) (Figure 7C, top row). In the case of the Arg762Gly substitution, the insertion of a Gly residue is predicted to destabilize the protein in the C-terminus of the last TM helix (gain of flexibility) (Figure 7C, bottom row).

Protoplasts of a wild-type strain were transformed with wild-type or mutant (Pro282Leu) *pmtC::gfp::pyrG<sup>Afum</sup>* constructs. Expression of the mutant PmtC<sup>Pro282Leu</sup>::GFP form, but not that of the wild-type version, caused a strong inhibition of radial growth and conidiation (Figure 8A), as shown before for the null mutant [47,49]. This phenotype, in contrast to that shown by FLIP166 and the  $\Delta flbB$  strain expressing PmtC<sup>Pro282Leu</sup>::GFP (see before), suggests that the deletion of *flbB* suppresses partially the growth defects caused by the substitution by a leucine of proline in position 282 of PmtC (see the Discussion section).

Despite its low fluorescence levels, localization of wild-type PmtC was determined for the first time. PmtC localized, in both wild-type and  $\Delta flbB$  backgrounds, to structures resembling the endoplasmic reticulum (Figure 8B). As was described previously for ER proteins such as Sec63 and Sec12 [52,53], nuclear envelopes (NE in Figure 8B) as well as a faint network of interconnected tubules and patches (P) could be discerned in correlation with the predicted function of PmtC as a protein O-mannosyltransferase localized in the ER. Indeed, the induction of the unfolded protein response (UPR) and inhibition of growth triggered by the addition of 8 mM dithiothreitol (DTT) was accompanied by a relocalization of PmtC to bright and bigger spots (Figure 8C), as was described previously by Markina-Iñarrairaegui and colleagues for Sec63 [52]. Removal of DTT from the culture medium restored growth and the native localization of PmtC (Figure 8C, bottom).

Hyphae of the mutant Pro282Leu strain showed a hyperbranching phenotype that explained, at least partially, the phenotype described in Figure 8A (both pictures in Figure 8D correspond to the same hyphal networks analyzed in more detail in Figure 8B, left, and Figure 8E, left). Interestingly, we did not observe delocalization of PmtC due to Pro282Leu (wild-type and  $\Delta flbB$  backgrounds) or Arg762Gly ( $\Delta flbB$  background) substitutions (Figure 8E). These results suggest that residues Pro282 within TM helix 8 and Arg762 within the protein O-mannosyltransferase C-terminal domain are necessary for PmtC activity but may not be essential for its cellular localization.



**Figure 8.** Subcellular localization of PmtC: (A) Phenotypes of strains expressing a wild-type or a mutant Pro282Leu form of PmtC::GFP (wild-type background) after 60 h of culture on AMM (diameter of Petri dishes: 5.5 cm). Substitution of Pro282 by a Leu causes an inhibition of radial growth and an aconidial phenotype. (B) Subcellular localization of PmtC::GFP in wild-type or  $\Delta flbB$  hyphae: PmtC localizes to structures resembling the ER [52,53]. Scale bars = 5  $\mu$ m. (C) Localization of PmtC::GFP in wild-type hyphae before and 20, 40, and 60 min after the addition of 8 mM DTT [52]. Recovery of growth and native PmtC localization after the removal of DTT is also shown (bottom panel). Scale bar = 5  $\mu$ m. (D) Micrographs of hyphae of strains expressing PmtC::GFP or PmtC<sup>Pro282Leu</sup>::GFP chimeras (wild-type background). Arrowheads indicate the multiple adjacent branching sites observed in the mutant strain. (E) Subcellular localization of PmtC<sup>Pro282Leu</sup>::GFP (wild-type or  $\Delta flbB$  backgrounds) and PmtC<sup>Arg762Gly</sup>::GFP ( $\Delta flbB$  background) in hyphae. Both PmtC mutant forms maintain the localization of the wild-type form, suggesting that Pro282Leu or Arg762Gly substitutions affect PmtC activity but not its localization. Scale bar = 5  $\mu$ m.

## 4. Discussion

### 4.1. A Novel Mutagenesis Strategy as a Tool for the Identification of Hitherto Unknown Genes and Mutations Related to the Control of Conidiation

In their seminal works on *A. nidulans* conidiation, Timberlake proposed that more than a thousand different mRNAs accumulate to varying concentrations, specifically during this developmental process, while Martinelli and Clutterbuck reduced drastically the number of uniquely required genes to 45–100 [10,54,55]. In a more recent RNA-sequencing analysis, Garzia and collaborators described that approximately 2200 genes were significantly deregulated when RNA samples collected during vegetative growth and five hours after the induction of conidiation were compared [45]. More than

90% of them (2035 out of 2222) were significantly downregulated, while only a small fraction (187) was upregulated, introducing a consensus view for the abovementioned discrepancy. Although the number of functionally characterized direct or indirect regulators of conidiation is growing, it can be stated that we are still far from seeing the big picture on the mechanisms controlling asexual development and how they are coordinated with other fundamental cellular processes such as polar growth, sexual development, and the response to stress conditions. FlbB is one of these key regulators of conidiation, and here, we have added a collection of  $\Delta flbB$  mutants unable to produce conidia under stress caused by high concentrations of  $H_2PO_4^-$ . We have identified and carried out a preliminary functional characterization of SocA and have extended our knowledge on the localization and the role in conidiation of PmtC [47–49]. The future characterization of additional FLIP mutants may lead to the identification of new mutations in known regulators and/or the identification of hitherto unknown regulators of conidiation, furthering a deeper understanding and the updating of the current genetic and molecular models for the control of asexual sporulation in this ascomycete. Some of these genes may control *brlA* expression specifically in response to phosphate stress. In this work, we have sequenced *pmtC* in six FLIP mutants from phenotypic groups 2 and 3 (not shown) and all of them bore wild-type versions of the gene, suggesting that the mutations triggering the FLIP phenotype of these strains are not loss-of-function versions of *pmtC*. We are currently identifying these mutations.

#### 4.2. SocA, a Putative Transcriptional Regulator Probably Involved in the Control of Morphogenesis and Development under Specific Stress Conditions

*An8501/socA* has been identified here as a multicopy suppressor of aconidial FLIP166 and *flbB*<sup>-</sup> phenotypes. Our RNA-seq results indicate that there is no significant deregulation of its expression five hours after triggering asexual differentiation (not shown). The expression of specific UDA regulators of conidiation is increased at this time point, just before the upregulation of *brlA* [16,17]. This observation and the wild-type phenotype of null *socA* mutant (wild-type *flbB* background) in AMM suggest that this putative transcription factor is not directly involved in the regulation of *brlA* expression in particular and in the control of conidiation in general.

SocA was not included in the list of Zn2Cys6-type transcription factors after the update of the *A. nidulans* genome annotation [56] most probably due to the annotation error noticed here in the first exon and intron. Our evolutionary analysis of the corrected amino acidic sequence of SocA suggests that it emerged with the class of Eurotiomycetes, probably, as a duplication of an additional regulator including both the Zn finger (N-terminal) and the fungal transcriptional regulatory domain (C-terminal). Interestingly, multiple *Aspergilli* and *Penicilli* have a paralog of SocA. It is unknown whether this duplication has led to neofunctionalization (the development of new functions) or subfunctionalization (retention of a subset of the functions of the original paralog) events [57,58] or if any of these paralogs have retained in these species the functional relationship with conidiation described in the present work for *A. nidulans* SocA. Functional characterization of these paralogs is necessary to answer these questions.

SocA levels are not affected by the addition of 0.65 M  $H_2PO_4^-$  to AMM, and conidia production by the null *socA* strain (wild-type background) is not inhibited in these conditions. These results suggest that SocA is not a member of a hypothetical pathway required for the developmental response to phosphate stress. Nevertheless, the phenotype of the  $\Delta socA$  strain is completely different in a  $\Delta flbB$  background (also, that of the *socA::gfp* strain, highlighting the importance of the C-terminally located transcriptional regulatory domain in this response), with a clear inhibition of conidia production to the point of resembling a FLIP mutant of group 1. In this context, it has been proposed that, as well as the insertion of an additional regulator within a preexisting transcriptional network can cause its rewiring [58], deletion of a gene coding for a transcription factor can also trigger rewiring events [59]. Finally, constitutive upregulation of *socA* delays growth and modifies the germination pattern, suggesting that its levels must be precisely adjusted to optimize growth. Overall, these observations and the low *socA* expression levels before and after the induction of conidiation both in wild-type and  $\Delta flbB$

backgrounds suggest that this putative transcription factor is required under specific (and unknown) stress conditions and that its misscheduled deregulation alters growth and developmental patterns.

#### 4.3. Revisiting the Function of PmtC

Protein O-mannosyltransferases are involved in the mannosylation of target proteins at serine and threonine residues [51]. That is supposed to occur in the ER, while the addition of the rest of the carbohydrates to this mannosyl residue, conforming the final glycosylation step, is carried out in the Golgi apparatus. This role correlates with the localization of PmtC::GFP described in this work, which is not altered in Pro282Leu or Arg762Gly mutants, suggesting that the loss of function is not due to a delocalization of the protein. The ER–Golgi network is polarized in *A. nidulans*, and it organizes and delivers to the apical membrane (growth of fungal hyphae is polarized and the growth site is known as the apex) plasma membrane and cell-wall components (see, for example, Reference [60]). In this context, the inhibition of growth observed in the strain expressing the mutant PmtC<sup>Pro282Leu</sup> form was expected and is associated to a role of PmtC in the mannosylation of proteins involved in polar growth. For example, Kriangkripipat and Momany described that PmtC (and PmtA) modifies the putative plasma-membrane stress sensor and transducer WscA/An5660 [48]. Deletion of *wscA* inhibits significantly radial growth of *A. nidulans* colonies [61].

Interestingly, the growth phenotype observed as a consequence of introducing a Pro282Leu substitution in PmtC in the wild-type background is suppressed, at least partially, by deletion of *flbB*. We have previously observed in a  $\Delta flbB$  background a reversion of the growth defects caused by the deletion of the myosin-coding gene *myoB* (our unpublished results). These results suggest that there is a genetic link between the control of conidiation and polar growth. This hypothetical connection should be analyzed in the future.

The inhibition of conidiation observed in PmtC<sup>Pro282Leu</sup> mutants may be indirect due to the participation of PmtC in the mannosylation of a protein required for both growth and conidiation. It must be remembered that specific stages of conidiophore development, such as stalk or metulae emergence, are based on apical growth and are controlled by regulators of polarity [9,62]. However, PmtC might be involved directly in the mannosylation/glycosylation of a regulator of conidiation that transits the ER–Golgi network and, maybe, reaches the hyphal apex. The only known regulators of conidiation in *A. nidulans* showing an apical localization are FlbB and FlbE [14,15,26]. However, it is unlikely a direct role of PmtC in the posttranslational modification of FlbB. In that case, the FLIP166 mutant would show a conidiating phenotype in AMM supplemented with 0.65 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>−</sup> as does the  $\Delta flbB$  mutant and not an additive, completely aconidial phenotype. Thus, we predict that a hypothetical target of PmtC controlling conidiation should be a protein other than FlbB.

It has been proposed that Pmt4/PmtC forms not only homodimers in *A. nidulans* but also heterodimers with PmtA and PmtB [63]. Thus, mutations in the corresponding genes *pmtA* and *pmtB* will likely induce or contribute to the FLIP phenotype and may be identified in the study of the library of FLIP mutants available. Overall, the functional characterization of mutant forms of these or other hitherto unidentified proteins will deepen our understanding of how stimuli are transduced and integrated to coordinate morphogenetic, developmental, and viability processes.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/12/1520/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.E., E.A.E. and A.O.; investigation, A.O.; methodology, O.E., E.A.E., and A.O.; supervision, O.E. and E.A.E.; writing—original draft, O.E.; writing—review and editing, O.E., E.A.E. and A.O.

**Funding:** Work at the UPV/EHU lab was funded by UPV/EHU (grants EHUA15/08 and PPGA19/08 to O.E) and the Basque Government (grant IT599-13 to Prof. Unai Ugalde and grant Elkartek19/72 to Prof. María Teresa Dueñas). Work at CIB-CSIC was funded by MINECO (BFU2015-66806-R) and MICIU (RTI2018-094263-B-100) to E.A.E (both partially supported by FEDER, EU). A.O held a predoctoral fellowship from the Basque Government.

**Acknowledgments:** We want to thank A. Garzia (The Rockefeller University; NY; USA) for the assistance in the analysis of the sequencing results of the FLIP166 genome.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Hawksworth, D.L.; Lücking, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 4.
2. Kirk, P.; Cannon, P.; Minter, D.; Stalpers, J. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed.; CAN International: Wallingford, UK, 2008.
3. Etxebeste, O.; Otamendi, A.; Garzia, A.; Espeso, E.A.; Cortese, M.S. Rewiring of transcriptional networks as a major event leading to the diversity of asexual multicellularity in fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2019**, *7*, 1–16. [[CrossRef](#)]
4. Ojeda-López, M.; Chen, W.; Eagle, C.E.; Gutiérrez, G.; Jia, W.L.; Swilaiman, S.S.; Huang, Z.; Park, H.-S.; Yu, J.-H.; Cánovas, D.; et al. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud. Mycol.* **2018**, *91*, 37–59. [[CrossRef](#)]
5. De Vries, R.P.; Riley, R.; Wiebenga, A.; Aguilar-Osorio, G.; Amillis, S.; Uchima, C.A.; Anderluh, G.; Asadollahi, M.; Askin, M.; Barry, K.; et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* **2017**, *18*, 28. [[CrossRef](#)]
6. Park, H.-S.; Yu, J.-H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, *15*, 669–677. [[CrossRef](#)]
7. Fischer, R.; Kües, U. Asexual sporulation in mycelial fungi. In *Growth, Differentiation and Sexuality*; Kües, U., Fischer, R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 263–292.
8. Kües, U.; Badalyan, S.M.; Gießler, A.; Dörnte, B. Asexual sporulation in Agaricomycetes. In *Growth, Differentiation and Sexuality*; Wendland, J., Ed.; Springer International Publishing: Basel, Switzerland, 2016; pp. 269–328.
9. Mims, C.W.; Richardson, E.A.; Timberlake, W.E. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **1988**, *144*, 132–141. [[CrossRef](#)]
10. Adams, T.H.; Wieser, J.K.; Yu, J.-H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 35–54.
11. Etxebeste, O.; Espeso, E.A. *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: A top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *Int. Microbiol.* **2019**, *2*, 1–18. [[CrossRef](#)]
12. Oiartzabal-Arango, E.; Perez-de-Nanclares-Arregi, E.; Espeso, E.A.; Etxebeste, O. Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **2016**, *62*, 371–377. [[CrossRef](#)]
13. Park, H.-S.; Lee, M.-K.; Han, K.-H.; Kim, M.-J.; Yu, J.-H. Developmental Decisions in *Aspergillus nidulans*. In *Biology of the Fungal Cell*; Hoffmeister, D., Gressler, M., Eds.; Springer International Publishing: Basel, Switzerland, 2019; pp. 63–80.
14. Otamendi, A.; Perez-de-Nanclares-Arregi, E.; Oiartzabal-Arango, E.; Cortese, M.S.; Espeso, E.A.; Etxebeste, O. Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *5*, 1–22. [[CrossRef](#)]
15. Herrero-García, E.; Perez-de-Nanclares-Arregi, E.; Cortese, M.S.; Markina-Iñarrairaegui, A.; Oiartzabal-Arango, E.; Etxebeste, O.; Ugalde, U.; Espeso, E.A. Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells. *Mol. Microbiol.* **2015**, *98*, 607–624. [[CrossRef](#)]
16. Garzia, A.; Etxebeste, O.; Herrero-García, E.; Ugalde, U.; Espeso, E.A. The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 1314–1324. [[CrossRef](#)]
17. Etxebeste, O.; Ni, M.; Garzia, A.; Kwon, N.J.; Fischer, R.; Yu, J.H.; Espeso, E.A.; Ugalde, U. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 38–48. [[CrossRef](#)]
18. Rodríguez-Urra, A.B.; Jiménez, C.; Nieto, M.I.; Rodríguez, J.; Hayashi, H.; Ugalde, U. Signaling the Induction of Sporulation Involves the Interaction of Two Secondary Metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 599–606. [[CrossRef](#)]

19. Skromne, I.; Sanchez, O.; Aguirre, J. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **1995**, *141*, 21–28. [[CrossRef](#)]
20. Etxebeste, O.; Herrero-García, E.; Cortese, M.S.; Garzia, A.; Oartzabal-Arano, E.; de los Ríos, V.; Ugalde, U.; Espeso, E.A. GmcA is a putative glucose-methanol-choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40292. [[CrossRef](#)]
21. Etxebeste, O.; Herrero-García, E.; Araújo-Bazán, L.; Rodríguez-Urra, A.B.; Garzia, A.; Ugalde, U.; Espeso, E.A. The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 775–789. [[CrossRef](#)]
22. Osherov, N.; Mathew, J.; May, G.S. Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, *31*, 181–188. [[CrossRef](#)]
23. Cove, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta Enzymol. Biol. Oxid.* **1966**, *113*, 51–56. [[CrossRef](#)]
24. Käfer, E. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **1965**, *52*, 217–232.
25. Galindo, A.; Calcagno-Pizarelli, A.M.; Arst, H.N.; Peñalva, M.Á. An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1784–1795. [[CrossRef](#)]
26. Garzia, A.; Etxebeste, O.; Herrero-Garcia, E.; Fischer, R.; Espeso, E.A.; Ugalde, U. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 172–184. [[CrossRef](#)]
27. Peñalva, M.A. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, *42*, 963–975. [[CrossRef](#)]
28. Pantazopoulou, A.; Peñalva, M.A. Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 4335–4347. [[CrossRef](#)]
29. Yang, L.; Ukil, L.; Osmani, A.; Nahm, F.; Davies, J.; De Souza, C.P.C.; Dou, X.; Perez-Balaguer, A.; Osmani, S.A. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 1359–1362. [[CrossRef](#)]
30. Tilburn, J.; Scazzocchio, C.; Taylor, G.G.; Zabicky-Zissman, J.H.; Lockington, R.A.; Davies, R.W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **1983**, *26*, 205–221. [[CrossRef](#)]
31. Szewczyk, E.; Nayak, T.; Oakley, C.E.; Edgerton, H.; Xiong, Y.; Taheri-Talesh, N.; Osmani, S.A.; Oakley, B.R. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 3111–3120. [[CrossRef](#)]
32. Todd, R.B.; Davis, M.A.; Hynes, M.J. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 811–821. [[CrossRef](#)]
33. Todd, R.B.; Davis, M.A.; Hynes, M.J. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 822–830. [[CrossRef](#)]
34. Upshall, A.; Giddings, B.; Mortimore, I.D. The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *Microbiology* **1977**, *100*, 413–418. [[CrossRef](#)]
35. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 24–26. [[CrossRef](#)]
36. Mitchell, A.L.; Attwood, T.K.; Babbitt, P.C.; Blum, M.; Bork, P.; Bridge, A.; Brown, S.D.; Chang, H.-Y.; El-Gebali, S.; Fraser, M.I.; et al. InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 351–360. [[CrossRef](#)]
37. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
38. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 256–259. [[CrossRef](#)]
39. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 296–303. [[CrossRef](#)]
40. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858. [[CrossRef](#)]
41. Rodrigues, C.H.M.; Pires, D.E.V.; Ascher, D.B. DynaMut: Predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 350–355. [[CrossRef](#)]

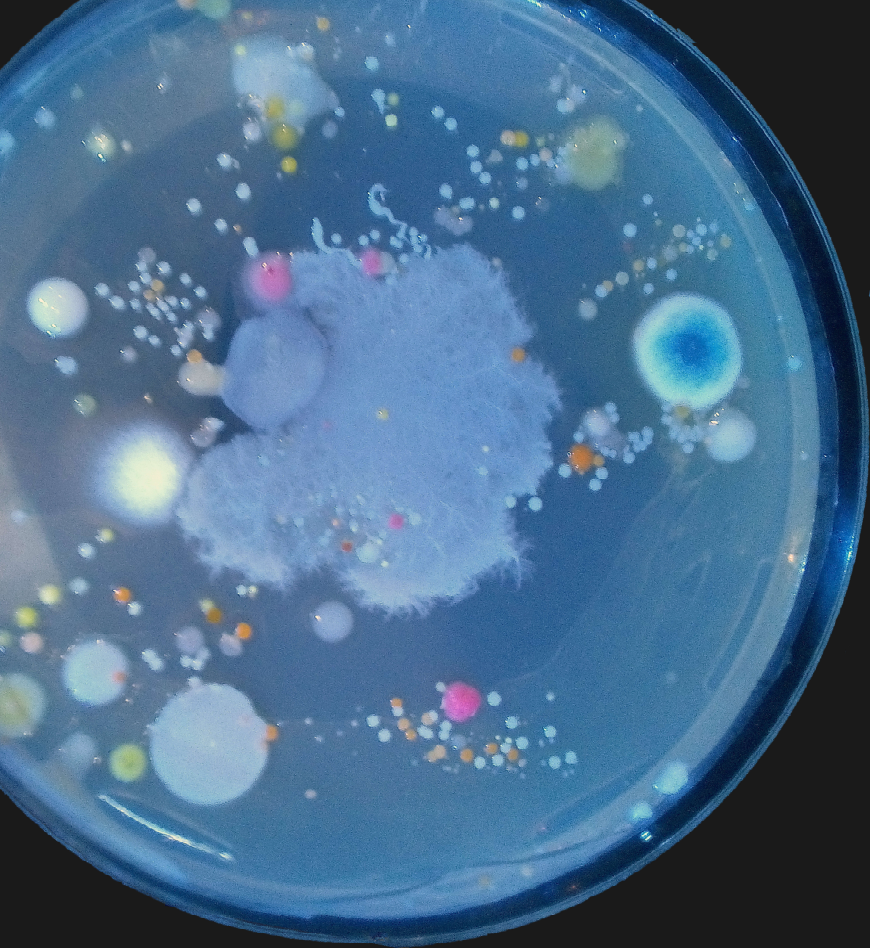
42. Hervás-Aguilar, A.; Peñalva, M.A. Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2010**, *9*, 1504–1518. [[CrossRef](#)]
43. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]
44. Oartzabal-Arango, E.; Garzia, A.; Gorostidi, A.; Ugalde, U.; Espeso, E.A.; Etxebeste, O. Beyond asexual development: Modifications in the gene expression profile caused by the absence of the *Aspergillus nidulans* transcription factor FlbB. *Genetics* **2015**, *199*, 1127–1142. [[CrossRef](#)]
45. Garzia, A.; Etxebeste, O.; Rodríguez-Romero, J.; Fischer, R.; Espeso, E.A.; Ugalde, U. Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 311–321. [[CrossRef](#)]
46. Reiser, K.; Davis, M.A.; Hynes, M.J. AoxA is a major peroxisomal long chain fatty acyl-CoA oxidase required for  $\beta$ -oxidation in *A. nidulans*. *Curr. Genet.* **2010**, *56*, 139–150. [[CrossRef](#)]
47. Goto, M.; Harada, Y.; Oka, T.; Matsumoto, S.; Takegawa, K.; Furukawa, K. Protein O-Mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 1465–1474. [[CrossRef](#)]
48. Kriangkripiat, T.; Momany, M. *Aspergillus nidulans* Protein O-Mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 1475–1485. [[CrossRef](#)]
49. Le, T.H.T.; Oki, A.; Goto, M.; Shimizu, K. Protein O-mannosyltransferases are required for sterigmatocystin production and developmental processes in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **2018**, *64*, 1043–1056. [[CrossRef](#)]
50. Willer, T.; Valero, M.C.; Tanner, W.; Cruces, J.; Strahl, S. O-mannosyl glycans: From yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 621–630. [[CrossRef](#)]
51. Loibl, M.; Strahl, S. Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 2438–2446. [[CrossRef](#)]
52. Markina-Iñarrairaegui, A.; Pantazopoulou, A.; Espeso, E.A.; Peñalva, M.A. The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: Disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67154. [[CrossRef](#)]
53. Bravo-Plaza, I.; Hernández-González, M.; Pinar, M.; Díaz, J.F.; Peñalva, M.A. Identification of the guanine nucleotide exchange factor for SAR1 in the filamentous fungal model *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118551. [[CrossRef](#)]
54. Timberlake, W.E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **1980**, *78*, 497–510. [[CrossRef](#)]
55. Martinelli, S.D.; Clutterbuck, A.J. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **1971**, *69*, 261–268. [[CrossRef](#)]
56. Wortman, J.R.; Gilson, J.M.; Joardar, V.; Deegan, J.; Clutterbuck, J.; Andersen, M.R.; Archer, D.; Bencina, M.; Braus, G.; Coutinho, P.; et al. The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: A community effort. *Fungal Genet Biol* **2009**, *46*, 2–13. [[CrossRef](#)]
57. Sorrells, T.R.; Johnson, A.D. Making Sense of Transcription Networks. *Cell* **2015**, *161*, 714–723. [[CrossRef](#)]
58. Voordeckers, K.; Pougach, K.; Verstrepen, K.J. How do regulatory networks evolve and expand throughout evolution? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 180–188. [[CrossRef](#)]
59. Dai, Z. Transcription Factors indirectly regulate genes through nuclear colocalization. *Cells* **2019**, *8*, 754. [[CrossRef](#)]
60. Riquelme, M.; Aguirre, J.; Bartnicki-García, S.; Braus, G.H.; Feldbrügge, M.; Fleig, U.; Hansberg, W.; Herrera-Estrella, A.; Kämper, J.; Kück, U.; et al. Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2018**, *82*, e00068-17. [[CrossRef](#)]
61. Futagami, T.; Nakao, S.; Kido, Y.; Oka, T.; Kajiwara, Y.; Takashita, H.; Omori, T.; Furukawa, K.; Goto, M. Putative stress sensors WscA and WscB are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress tolerance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 1504–1515. [[CrossRef](#)]

62. Virag, A.; Lee, M.P.; Si, H.; Harris, S.D. Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 1579–1596. [[CrossRef](#)]
63. Kriangkripiat, T.; Momany, M. *Aspergillus nidulans* Pmts form heterodimers in all pairwise combinations. *FEBS Open Bio.* **2014**, *4*, 335–341. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





**Kimika Aplikatua**  
**Kimikako Fakultatea**  
**Euskal Herriko Unibertsitatea**