

Biokimika II
Kimila Aplikatua
Kimika Fakultatea
Donostia

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Mecanismos Moleculares de la Inducción de la Esporulación en *Aspergillus nidulans*

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

Aitor Garzia
Donostia
2011

Directores de Tesis:

Unai O. Ugalde
Profesor titular
Facultad de Ciencias Químicas
EHU/UPV

Eduardo A. Espeso Fernández
Científico Titular
Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC Universidad



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Facultad de Ciencias Químicas de Donostia (EHU/UPV) bajo la dirección del Dr. **Unai O. Ugalde Martínez**, Profesor Titular de la EHU/UPV, y el Dr. **Eduardo A. Espeso Fernández**, Científico Titular del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos del Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto BFU2004-03499/BMC, del Gobierno Vasco a través del proyecto IT393-10 y por una beca del Programa de Formación de Personal Investigador del Gobierno Vasco al doctorando **Aitor Garzia Agirrezabala**.

Aita eta Amari

Idoia, Javi eta Beñati

ESKERRAK/AGRADECIMIENTOS:

Idatzi beharreko guztietatik hau izan daiteke orrialde zailena. Hainbeste gauza esan eta hainbeste gauza eskertu nahiko nituzke denbora honetan zehar lagundu didan jende guztiari, eztakitela nondik hasi. Inoiz ez naiz oso pertsona expresiboa izan, baina guztiengandik jasotako babesak hitz soil hauek baina askoz gehiago merezi du. Nire esker zintzoenak eskaini nahiko nizkieke:

Lehenengo tokian Unairi, nigan jarri zuen konfidantzagatik. Zure laborategiko ateak ireki zenizkidan zure eskuzabaltasuna erakutsiz eta mundu berri batean sartzeko aukera eman zenidan, zientzia eta ikerketa mundua. Inoiz ezingo dizut nahikoa eskertu.

Edu, zer esan diezazuket. Transmititu dizkidazun ezaguera kontaezinak ez dira ezer zugandik jasotako babesaren ondoan. Beti izan duzu denbora eta pazientzia entzuteko eta nire momentu txarretan aholkatzeko. Eskerrikasko denagatik!

Quizá ésta sea la página más difícil de escribir de todas. Quisiera decir y agradecer tantas cosas a toda la gente que me ha ayudado durante este periodo que no sé por donde empezar. Nunca he sido una persona muy expresiva, pero el apoyo mostrado por todos ellos se merece mucho más que estas simples palabras. Me gustaría mostrar mi más sincera gratitud:

En primer lugar a Unai por la confianza depositada en mí. Tú me abriste desinteresadamente la puerta de tu laboratorio y me diste la oportunidad de introducirme en un nuevo mundo, el de la ciencia e investigación, algo que nunca podré agradecerte lo suficiente.

A Edu, qué te puedo decir. Los innumerables conocimientos que me has transmitido no son nada al lado de todo el apoyo recibido por tu parte. Siempre has tenido tiempo y paciencia para escucharme y aconsejarme en mis malos momentos. ¡Muchas gracias por todo!

Esporulazio proiektuaren barnean nire kideak izan direnei. Oier, zure ondoan ikerlari bilakatu naiz, batek nahi duenagatik borrakatzea erakutsi didazu eta beti egon zera prest laguntza eskaintzeko. Erika, beharrezkoa izan den momentuetan deskonektatzea egin didazu, benetako lagun bat zeala erakutsiz. Eta Marc, ikuspuntu berri bat azaldu didazu, ez zientzian bakarrik, baita bizitzan ere.

Denbora honetan zehar izan ditudan laborategiko gainontzeko kideei igarotako orduak atsegin eta dibertigarriagoak eginaraztea eskertu nahiko nizkizueke: Ana, Susana, Idoia, Gaizka, Olatz, Ainara, Ana P. Zuengandik oroitzapen zoragarriak eramango ditut. Ez ditut ahaztu nahi CIB-n ezagututako lankideak, beraien laguntza eskaini zidatenak han igarotako egonaldietan: Elena, Lidia, Ame, Olga, Juanfran, Aretí, Antonio eta batez ere Ane.

Reinhard Fischer eta bere laborategiko kide guztiei han igarotako hilabeteetan bat gehiago izango banintz bezela tratatzeagatik. Bereziki Julio eta Cristinari, lagun bati bezela hartzeagatik lehen egunetik eta Nataliari bere poztasun, gar eta harreragatik.

A mis compañeros dentro del proyecto de la conidiación. Junto a Oier me he formado como investigador, me has enseñado a luchar por lo que uno quiere y siempre me has tendido una mano. Erika me has hecho desconectar en los momentos necesarios demostrando ser una verdadera amiga. Y Marc me has mostrado otro punto de vista, no sólo de la ciencia sino de la vida.

Al resto de compañeros de laboratorio que he tenido durante este tiempo quisiera agradecerlos el haberme hecho mucho más amenas y divertidas las horas transcurridas: Ana, Susana, Idoia, Gaizka, Olatz, Ainara, Ana P. De todos vosotros me llevo grandes recuerdos. No me quiero olvidar de los compañeros que he conocido en el CIB. Todos ellos me ofrecieron su ayuda durante mis estancias allí: Elena, Lidia, Ame, Olga, Juanfran, Aretí, Antonio y sobre todo Ane.

A Reinhard Fischer y a todos los miembros de su laboratorio por haberme tratado como uno más los meses que estuve en Karlsruhe. En especial me gustaría mencionar a Julio y Cristina por tratarme como a un amigo desde el primer día y a Natalia por su alegría, entusiasmo y hospitalidad.

Ezingo nuen bukatu beti hor egon diren eta hainbeste maite ditudan pertsoneri eskertu gabe. Nere gurasoei ezingo nien inoiz eskertu nigatik egindako guztia. Beti izan dute konfidantza nigan eta gaur egun naizen guztia beraiei esker da. Idoia eta Javi beti kezkatu dira nigatik, ulertu eta errespetatu didate eta beraien esku egon den guztia egin dute. Eta Beñati, nahiz eta ez den gai ulertzeko zenbat lagundu didan egunein beste poztasun batekin aurre egiteko orduan, asko dela ziurtatu baitezaket.

Eta azkenik nire lagun guztiei, beraiek ondoan izateagatik zein zorioneko naizen erakusteagatik. Bakoitzak bere momentuan eta bere erara, baina asko dira azken 5 urteotan lagundu didatenak, eta horregatik tesi honen zati bat beraiena da.

No puedo terminar sin agradecer a todas las personas que siempre han estado ahí y que tanto quiero. A mis padres no podría nunca agradecerles todo lo que han hecho por mí. Siempre han confiado en mí y han hecho de mí lo que soy. Idoia y Javi, siempre se han preocupado por mí, me han entendido y respetado y han hecho todo lo posible para hacerme sentir mejor. Y a Beñat, que aunque no sea consciente de todo lo que me ha ayudado y alegrado en el día a día, puedo asegurar que es mucho.

Y por último a todos mis amigos y amigas por haberme demostrado que soy muy afortunado de tenerlos. Cada uno en su momento y a su manera, pero son muchos los que me han ayudado en estos más de cinco años y parte de esta tesis es para ellos.

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no transcrita
5'UTR	Región 5' no transcrita
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido Ribonucleico
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
bZip	Dominio de cremallera de leucina (Basic Zipper)
CDP	ruta central del desarrollo o <i>central developmental pathway</i>
CDS	Secuencia codificante
CR	Proteína roja fluorescente <i>CherryRed</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de Movilidad Electroforética (Retardo en Gel)
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación-S-transferasa
GTP/GDP	Guanosin trifosfato/difosfato
HEPES	Ácido 4-[2-hidroxietyl]-1-piperazinetanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton (=1000Da)
LB	Luria-Bertani
MCA	Medio completo <i>Aspergillus</i>
MES	Ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico
MFA	Medio fermentación <i>Aspergillus</i>
MMA	Medio mínimo <i>Aspergillus</i>
MMR	Medio mínimo de regeneración
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico
mRFP	Proteína monomérica roja fluorescente
nt	Nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especie reactiva de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
UDA	Activadores de la regulación temprana o <i>upstream developmental activators</i>
YFP	Proteína amarilla fluorescente

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<u>1. Generalidades y Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i></u>	3
<u>2. Crecimiento vegetativo</u>	6
<u>3. La reproducción asexual y su regulación</u>	9
<u>3.1. Reconocimiento y respuestas tempranas a estímulos ambientales</u>	11
<u>3.2. Inicio de la formación del conidióforo</u>	16
<u>3.3. Finalización del proceso: formación de fiálidas y conidiogénesis</u>	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
<u>1. Cepas y oligonucleótidos utilizados</u>	29
<u>2. Condiciones de cultivo</u>	38
<u>3. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i></u>	41
<u>4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos</u>	44
<u>4.1. Extracción de ADN genómico de <i>A. nidulans</i></u>	44
<u>4.2. Extracción de ARN total de <i>A. nidulans</i></u>	44
<u>4.3. Generación de mutante nulo, etiquetado o de sobreexpresión ..</u>	45
<u>4.4. Southern blot</u>	47
<u>4.5. Northern blot</u>	49

<u>5. Técnicas de biología molecular en <i>E. coli</i></u>	50
5.1. Medios para <i>E. coli</i>	50
5.2. Transformación de <i>E. coli</i>	50
5.3. Extracción de ADN plasmídico	51
5.4. Expresión de proteínas recombinantes de <i>E. coli</i>	51
<u>6. Aislamiento y manipulación de proteínas de <i>A. nidulans</i></u>	51
6.1. Extracción de proteínas totales	51
6.2. Western blot	52
6.3. Ensayos de Pull-Down	53
<u>7. Ensayos de unión ADN-proteína</u>	53
7.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).....	53
7.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	55
<u>8. Microscopia</u>	56
8.1. Condiciones de cultivo para experimentos de microscopía	56
8.2. Microscopio y obtención de imágenes	56

LOS REGULADORES TEMPRANOS DE LA CONIDIACIÓN, SU DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y POSIBLES INTERACCIONES . 59

<u>1. Introducción</u>	61
<u>2. Resultados y Discusión</u>	63
2.1. Factores de regulación temprana sin distribución específica en la célula	63
2.2. Factores de regulación temprana exclusivamente nucleares	65

2.3. *Factores de regulación temprana apicales* 68

**PARTICIPACIÓN DE FACTORES DE REGULACIÓN TEMPRANA
EN LA PUNTA DE LA HIFA 71**

1. Introducción 73

2. Resultados 73

2.1. *flbE codifica una proteína específica de hongos filamentosos
con dominios conservados de función desconocida* 73

2.2. *Caracterización fenotípica de los mutantes en flbE* 77

2.3. *FlbE y FlbB son necesarios para la producción de un
mismo metabolito necesario para la conidiación* 81

2.4. *FlbE y FlbB se asocian en la punta de la hifa durante el
crecimiento vegetativo* 82

2.5. *La localización apical de FlbE y FlbB es dependiente
del citoesqueleto de actina* 86

2.6. *flbE se expresa a lo largo de todo el ciclo vital* 87

3. Discusión 91

**INTERRELACIÓN ENTRE LOS FACTORES DE REGULACIÓN
TEMPRANA Y LA RUTA CENTRAL DEL DESARROLLO 95**

1. Introducción 97

2. Resultados 98

2.1. Evidencias de una cascada de señalización no lineal en el desarrollo asexual	98
2.2. flbD y flbB muestran patrones de expresión similares a lo largo del ciclo de vida	100
2.3. El complejo apical FlbB/E es necesario para la correcta expresión de flbD	100
2.4. El factor de transcripción FlbB se une al promotor de flbD in vivo	104
2.5. FlbD y FlbB se requieren mutuamente para la activación de brlA	107
2.6. FlbD es un factor de transcripción del tipo cMyb	108
2.7. FlbB y FlbD unen coordinadamente al promotor de brlA in vivo	110
2.8. La activación de brlA no reprime la expresión de flbB y flbD .	113
2.9. Primera aproximación a la acción de FlbC en la regulación temprana de la conidiación	114
<u>3. Discusión</u>	120
DISCUSIÓN GENERAL	125
CONCLUSIONES	143

BIBLIOGRAFÍA 147**ANEXOS 165**

Etxebeste, O., M. Ni, **A. Garzia**, N. J. Kwon, R. Fischer, J. H. Yu, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7**: 38-48.

Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, R. Fischer, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Molecular Microbiology* **71**: 172-184.

Etxebeste, O., E. Herrero-García, L. Araújo-Bazán, A. B. Rodríguez-Urra, **A. Garzia**, U. Ugalde & E. A. Espeso, (2009) The bZip-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **73**: 775-789.

Etxebeste, O., A. Markina-Iñarrairaegui, **A. Garzia**, E. Herrero-García, U. Ugalde & E. A. Espeso, (2009) Kap1, a non-essential member of the Pse1p/Imp5 karyopherin family, controls colonial and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **155**: 3934-3945.

Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, U. Ugalde & E. A. Espeso, (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **75**: 1314-1324.

Kwon, N. J., **A. Garzia**, E. A. Espeso, U. Ugalde & J. H. Yu, (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **77**: 1203-1219.

Etxebeste, O.*, **A. Garzia***, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology* **18**: 569-576.

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

Herrero-García, E., **A. Garzia**, S. Cordobés, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2011) 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology* **115**: 393-400.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades y Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

Las actividades biológicas de los hongos filamentosos han suscitado gran interés en diferentes campos, como la industria alimentaria o en la obtención de metabolitos. El organismo objeto de estudio en esta tesis doctoral, *Aspergillus (Emericella) nidulans*, es una de las casi 15.000 especies de Ascomycetos, de la clase Eurotiomycetos perteneciente a la familia Trichocomaceae (Thom & Raper, 1945, Pontecorvo *et al.*, 1953). Su genoma de 30,06 millones de pares de bases está organizado en 8 cromosomas y alberga alrededor de 10.700 genes (Galagan *et al.*, 2005). La secuencia del genoma está accesible en la base de datos del Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html) o en el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (<http://www.aspergillusgenome.org/>).

Cabe destacar que *A. nidulans* constituye un modelo genético de referencia para otros miembros de su género de gran interés económico, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en medicina, como *A. fumigatus*. Su capacidad para formar esporas sexuales mediante meiosis, la existencia de un ciclo sexual y el carácter homotálico (Dyer *et al.*, 2003), o su utilización en estudios genéticos y de biología celular han facilitado su uso como modelo experimental para alcanzar una mejor comprensión de varios procesos biológicos. También ha sido objeto de estudios como la recombinación y reparación de ADN, control del ciclo celular y de metabolismo primario y secundario (Nierman *et al.*, 2005).

El ciclo de vida de *A. nidulans* se caracteriza por la presencia de cuatro estadios diferenciados (Fig I1; (Adams *et al.*, 1998, Todd *et al.*, 2007b, Todd *et al.*, 2007a)): crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y el ciclo parasexual. El ciclo comienza con la germinación de una conidiospora mononucleada o una ascoespora binucleada, la cual da lugar a un tubo de germinación que crece de forma filamentosa como una hifa vegetativa haploide. Dicha germinación se inicia con el establecimiento de un punto de polaridad determinado de la espora/ascoespora (Harris, 1997, Momany, 2002, Harris & Momany, 2004), desplazando hasta ese punto toda la maquinaria requerida para la extensión de la hifa (D'Enfert, 1997, Osharov & May, 2001). Así, mediante crecimiento polar y adición de nuevo material en la punta (Momany, 2002), las hifas se extienden dando lugar a sincitios multinucleados,

formando un entramado de hifas interconectadas denominado micelio.

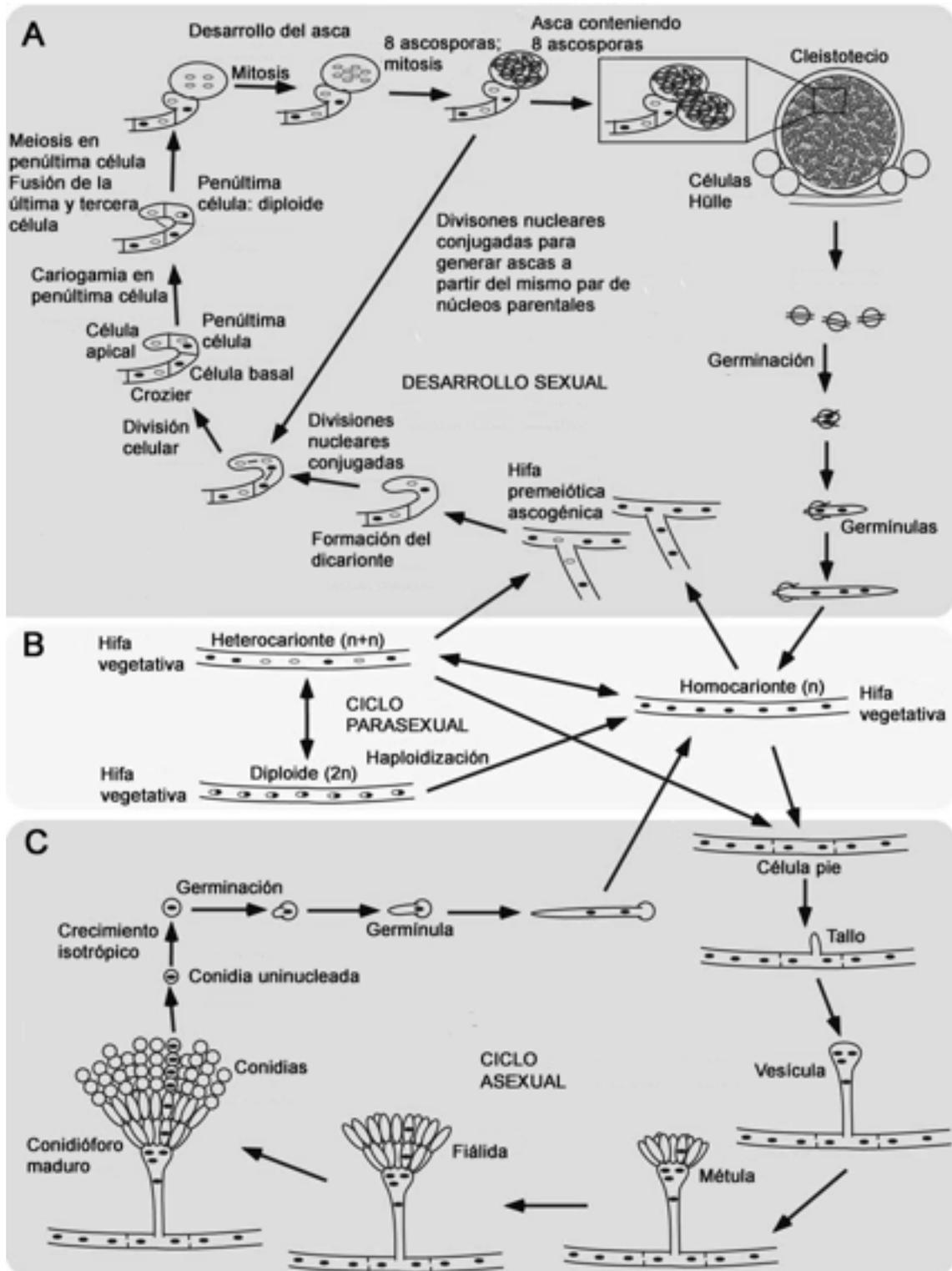


Fig 11. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. A) Desarrollo sexual: esquema del proceso de formación de cleistotecios conteniendo ascosporas en su interior; B) Ciclo parasexual: formación de diploides o heterocariontes; C) Ciclo asexual: proceso de formación de conidióforos. Modificado a partir de Todd *et al* (2007a).

El micelio se expande de forma radial hasta que transcurren unas 18 horas, momento en el que se comienzan a producir las estructuras de esporulación asexual, denominadas conidióforos, que en esta introducción recibirán un tratamiento detallado en siguientes apartados.

A la formación del conidióforo le sucede la iniciación del ciclo de reproducción sexual (Fig I1), que se suele observar en zonas maduras de la colonia. Este proceso se inicia con la formación de una célula diploide en una estructura característica denominada *crozier*. A partir de esta célula diploide se generan ascas compuestas de ocho esporas, recubiertas por una pared, y constituyendo el cleistotecio. El proceso se repite formando nuevos *crozier* y, por consiguiente, nuevos cleistotecios. Cada cleistotecio puede contener hasta 10.000 ascosporas (Todd *et al.*, 2007b) y se encuentran habitualmente rodeados de grupos de células denominadas células Hülle.

Por último, el ciclo parasexual en *Aspergillus nidulans* (Fig I1) se caracteriza por la fusión entre germínulas o hifas maduras durante la fase vegetativa, dando lugar a un intercambio de material, que en el primer caso se denomina anastomosis (Hickey *et al.*, 2002, Glass *et al.*, 2004). El mecanismo desencadenante de dicha fusión no ha sido aclarado todavía en *A. nidulans*, pero se ha planteado la posibilidad de que esté controlado por el comportamiento dinámico de vesículas localizadas en la punta de cada hifa (Glass *et al.*, 2004). La mayoría de trabajos al respecto se han realizado en *Neurospora crassa*, y en ellos se ha descrito que la fusión es causada mediante hifas especializadas conocidas como tubos de anastomosis conidial (CAT). La fusión de los CAT crea una red de germínulas interconectadas durante el inicio del desarrollo de la colonia. En los estadios más avanzados, en la colonia madura, ocurre un proceso semejante detrás de la zona periférica de las hifas, las cuales están principalmente implicadas en la extensión de la colonia. En esta región las hifas especializadas para la fusión se presentan como ramificaciones que crecen hacia otras células del mismo tipo hasta fusionarse (Read *et al.*, 2009). En el caso de que las hifas fusionadas pertenezcan a cepas con diferente fondo genético, se generan heterocariontes, los cuales, presentan núcleos con diferente dotación genética (Pontecorvo *et al.*, 1953, Glass *et al.*, 2000).

2. Crecimiento vegetativo

Las hifas vegetativas de *Aspergillus nidulans* son sincitios multinucleados que mantienen el crecimiento polar desde la germinación y que continúa durante la mitosis (Momany, 2002, Riquelme *et al.*, 2003, Horio, 2007). Una vez ocurrida la germinación de una conidiospora o una ascospora, y tras un período de crecimiento que comprende tres divisiones nucleares, se genera el primer septo, para lo que se requiere un determinado volumen celular y un proceso mitótico (Fig I2; (Wolkow *et al.*, 1996)). La septación resulta en un intercambio selectivo de nutrientes y efectores entre las células, y es seguida por la formación de ramificaciones laterales, generando un nuevo punto de crecimiento polar. Esto puede resultar en la interconexión de diferentes ramificaciones (Fig I2; (Hickey *et al.*, 2002, Glass *et al.*, 2004)), formando así los antes mencionados micelios.

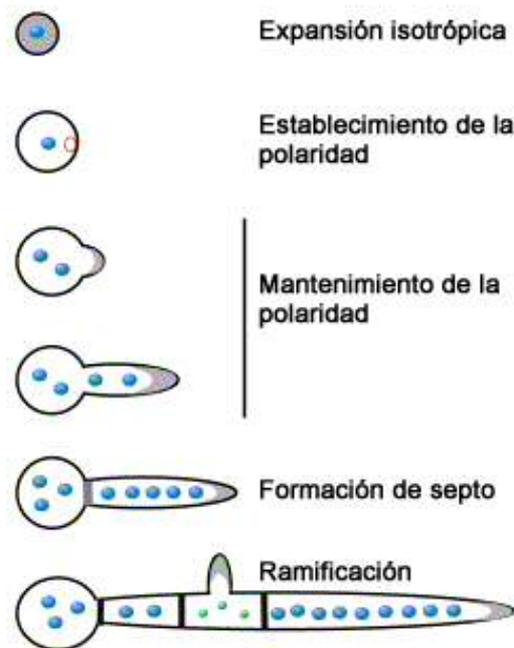


Fig I2. Morfogénesis en *Aspergillus nidulans*. Las zonas grises señalan las zonas responsables de crecimiento. Los círculos azules representan núcleos en interfase y los verdes núcleos en mitosis. El círculo rojo abierto señala el punto de establecimiento de la polaridad. Modificado a partir de Momany (2002).

La comprensión del mecanismo que genera y mantiene el crecimiento polar es hoy en día uno de los mayores retos de la biología celular en hongos (Steinberg, 2007). Los estudios realizados en este campo han dado a conocer que la maquinaria para el

establecimiento del crecimiento polar está altamente conservada. Así, al igual que en *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los efectores clave en la activación del crecimiento polar es Cdc42, una GTPasa tipo Rho (Pruyne & Bretscher, 2000). Cdc24 es reclutado en el punto seleccionado para el establecimiento del crecimiento polar (Fig I3; (Zheng *et al.*, 1995)), recluta a Cdc42-GDP y promueve el intercambio $\text{GDP} \rightarrow \text{GTP}$ para generar la forma activa Cdc42-GTP (Ziman *et al.*, 1993, Richman *et al.*, 2002). La señal de Cdc42-GTP es transmitida a multitud de efectores que finalmente activan la formación del citoesqueleto necesario para un correcto crecimiento polar. En algunos hongos evolutivamente más distantes de *S. cerevisiae*, como es el caso de *A. nidulans*, se ha identificado una segunda proteína con actividad GTPasa Rho, denominada Rac (Harris & Momany, 2004, Virag & Harris, 2006).

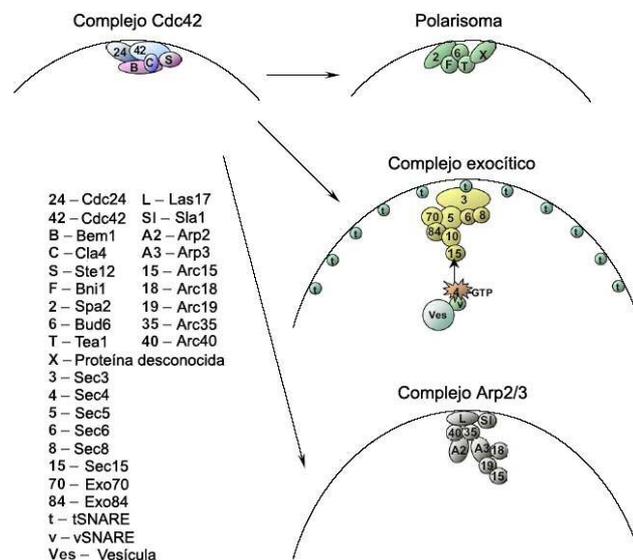


Fig I3. Complejos protéicos implicados en el crecimiento polar en *S. cerevisiae*. El complejo Cdc42 interacciona con los otros tres complejos señalados. La nomenclatura se describe en la imagen. Modificado a partir de Virag y Harris (2006a).

En *Saccharomyces cerevisiae* la activación de Cdc42, y a través del complejo multiprotéico denominado Polarisoma, regula la formación de filamentos o cables de actina. El componente más importante del Polarisoma en levadura es la formina Bni1, que sirve de punto de inicio de la nucleación de este tipo de complejos de actina (Fig I3; (Pruyne *et al.*, 2002, Sagot *et al.*, 2002a, Sagot *et al.*, 2002b)). El resto de componentes del Polarisoma parecen regular espacial y temporalmente la actividad de Bni1 (Sagot *et al.*, 2002b). La mayoría de estos componentes del Polarisoma se encuentran

conservados en *A. nidulans* y, aunque existen también diferencias entre los mecanismos de levadura y hongos filamentosos, sugieren una conservación mecánica en cuanto al ensamblaje de los filamentos de actina y el establecimiento y mantenimiento del crecimiento polar (Harris & Momany, 2004).

Durante el crecimiento, el material a añadir a la membrana plasmática en el ápice es transportado desde las zonas más distales de la célula a través de un mecanismo en el que los microtúbulos son utilizados como andamios o cables moleculares en el transporte de membranas, organelas, vesículas, moléculas de ARN y otros complejos protéicos (Steinberg, 2007). Se ha observado que en *Aspergillus nidulans* contribuyen a un correcto crecimiento polar, pero no parecen ser imprescindibles para ello (Horio & Oakley, 2005). El transporte de los diferentes cargamentos a través de los microtúbulos es posible gracias a la acción de dos familias de proteínas denominadas Quinesinas y Dineínas, las cuales, son capaces de desplazarse a lo largo de los microtúbulos. Las Quinesinas se desplazan hacia el extremo positivo del microtúbulo, mientras que las Dineínas lo hacen en sentido contrario.

En el ápice de la hifa, en proximidad de la maquinaria responsable del crecimiento polar se encuentra un cuerpo apical denominado *Spitzenkörper* (Girbardt, 1957). Sus movimientos preceden y dirigen el crecimiento de la punta (Reynaga-Pena *et al.*, 1997, Riquelme *et al.*, 2000), siendo esencial para el crecimiento polar (Bartnicki-García *et al.*, 1995). En este cuerpo se acumulan multitud de vesículas (micro y macro) transportadas hasta el ápice por microtúbulos y ya dentro del *Spitzenkörper* por microfilamentos de actina, controlando así la organización y el transporte de vesículas (Fig I4; (Harris *et al.*, 2005)). En el *Spitzenkörper* se pueden encontrar multitud de ribosomas o vesículas que provienen del aparato de Golgi mediante un proceso de exocitosis controlada. También, y dependiendo del organismo, se han encontrado factores implicados en un correcto crecimiento polar que son trasladados a los puntos de polarización en forma de mARN y que son traducidos allí *in situ* (Inglis & Johnson, 2002, Becht *et al.*, 2006, Aronov *et al.*, 2007, Zarnack & Feldbrügge, 2007). Por ello se ha planteado que el *Spitzenkörper* es un cuerpo subcelular dinámico, sugiriendo que podría incluso ser una extensión de aparato de Golgi y compuesta por diferentes complejos proteicos interaccionando entre ellos para mantener el correcto crecimiento polar (Harris *et al.*, 2005).

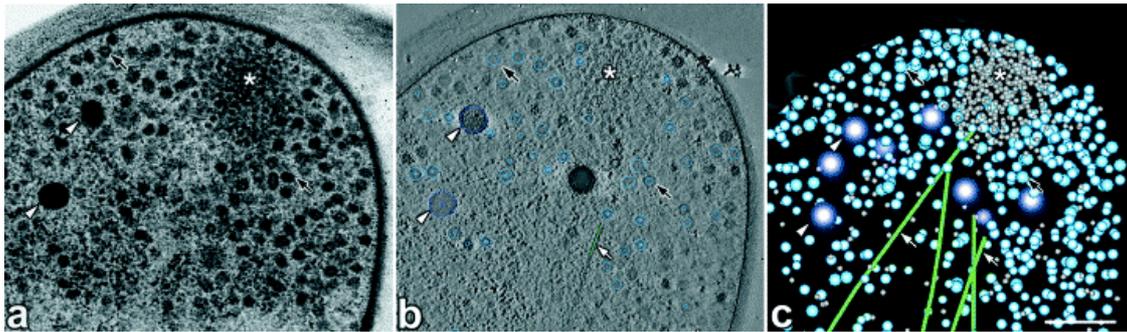


Fig 14. *Spitzkörper* en *Aspergillus nidulans*. El eje del cuerpo subcelular se señala mediante asterisco en las tres imágenes. A) Imagen TEM estándar (200nm de grosor; 200kV); B) Corte de alrededor de 5nm a lo largo del eje Z. Las vesículas apicales se señalan mediante flechas negras, los microtúbulos mediante la flecha blanca y los cuerpos de Woronin, sobre los que se desconoce si guardan relación con el crecimiento polar, mediante puntas de flecha blancas; C) Modelo mostrando una distribución en tres dimensiones del citoplasma apical. Barra de escala = 250nm. Modificado a partir de Harris *et al*, 2005.

3. La reproducción asexual y su regulación

Las hifas que conforman las colonias de *Aspergillus nidulans* pueden considerarse células pluripotentes capaces de iniciar distintos programas de diferenciación en función de los estímulos a los que sean expuestos. Por detrás de la zona de expansión, las hifas superficiales que emergen a la atmosfera y/o a la luz, inician una secuencia de transformaciones que darán lugar a la formación de estructuras complejas que producirán esporas, llamadas conidióforos (Adams *et al.*, 1998). La transición desde una hifa vegetativa a un conidióforo comienza con la formación de una célula pie y continúa con la aparición sucesiva del tallo, vesícula, métula, fiálida y finalmente esporas aéreas o conidias (Fig 15). La conidiación puede ser inducida no sólo tras la emergencia de la hifa a la atmosfera, sino también por algunas condiciones ambientales incompatibles con el crecimiento, como estrés nutricional, salino u osmótico (Skromne *et al.*, 1995, Calvo, 2008, Etxebeste *et al.*, 2009a). El desarrollo del conidióforo exige profundos cambios en el metabolismo de la colonia, con un gran incremento en la producción de metabolitos secundarios y la activación de un proceso autolítico en las hifas que rodean el conidióforo, presumiblemente proporcionando los recursos celulares necesarios a las nuevas estructuras en desarrollo (Calvo, 2008, Emri *et al.*, 2008).

Al examinar los estadios celulares que dan lugar al conidioforo, se observa que a excepción de la conidia, todos ellos son producto de la combinación de crecimiento polar e isotrópico (Fig I5). El proceso comienza con el ensanchamiento de la pared de una hifa superficial específica, dando lugar a la célula pie (Fig I5; (Adams *et al.*, 1998)). El tallo se extiende desde la célula pie como una pseudohifa aérea, 1-2 μm más ancha que una hifa vegetativa, y que se proyecta con un geotropismo negativo hasta una longitud media de 100 μm (Ni *et al.*, 2010). A ello le sigue una etapa de crecimiento isotrópico en la punta del tallo, que ocurre aproximadamente 6 horas después de la inducción, y da lugar a una estructura globular llamada vesícula, que alcanza un diámetro de 10 μm (Fig I5). Al contrario que las hifas vegetativas, los tallos y las vesículas no muestran ningún septo ni ramificación. Además, estas dos estructuras contienen grandes vacuolas que condicionan el posicionamiento nuclear y la distribución de orgánulos intracelulares (Etxebeste *et al.*, 2009b). A pesar de la ausencia de crecimiento polarizado, la vesícula alberga múltiples divisiones nucleares, produciendo aproximadamente 60 núcleos que se distribuyen bajo la superficie de la vesícula (Fig I5; (Mims *et al.*, 1988)). La estructura esférica sirve entonces como plataforma para múltiples puntos de gemación de células parecidas a las hifas y llamadas métulas, siguiendo un patrón que se asemeja a un proceso de germinación multipolarizado. Después de la entrada de un único núcleo en cada métula, se forma un septo que separa las métulas de la vesícula (Fischer & Kües, 2006). La métula no se extiende como la hifa, sino que experimenta una división especializada, dando lugar a dos nuevos brotes apicales aproximadamente 10 horas después de la inducción del desarrollo del conidioforo. Después de la maduración, estos brotes se convierten en células especializadas (fiálidas), las cuales producen una larga cadena de conidias de forma basipetal (Sewall *et al.*, 1990a). Los conidioforos maduros son visibles 15 horas después de la inducción del desarrollo.

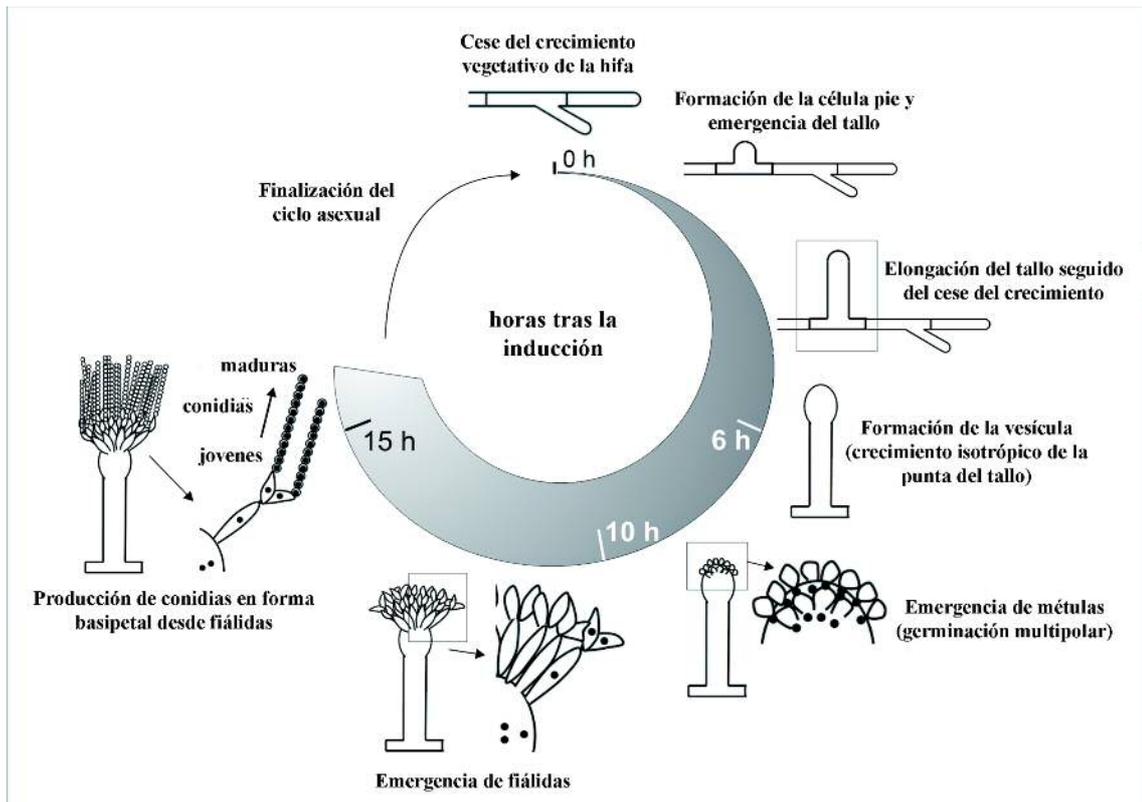


Fig 15. Transformaciones morfológicas que dan lugar a un conidióforo. Tras un cambio de las condiciones ambientales (tiempo cero), el crecimiento polar se inhibe en hifas vegetativas. Entonces una célula desarrolla una segunda pared interna para formar la célula pie, de la cual emerge el tallo elongándose hasta alcanzar una longitud definida. El crecimiento isotrópico (extensión en todas las direcciones) de la extremidad del tallo genera la vesícula. Tras múltiples divisiones nucleares, los núcleos (puntos negros) se distribuyen a través de la bóveda de la vesícula, de la cual emergen aproximadamente 60 métulas mononucleadas. Después de la extensión polar de la métula, emergen dos fiálidas de cada una, las cuales dan lugar a cadenas largas de conidios de una manera basipetal. Esto significa que los conidios jóvenes están cerca de la fiálida, mientras que los conidios maduros están situados en el extremo contrario de la cadena. Los conidióforos maduros se forman 15 horas después de la inducción del proceso. Modificado a partir de Etxebeste *et al.*, 2010.

3.1. Reconocimiento y respuestas tempranas a estímulos ambientales

Los estímulos ambientales causan cambios sostenidos en el comportamiento fisiológico del hongo. La combinación de la emergencia al aire con la luz por un lado o, por otro, condiciones de estrés, compromete el crecimiento e inducen la conidiación. Los factores de regulación que participan en la detección y transducción de dichas señales ambientales, así como los factores que ejercen un efecto sobre el cese del crecimiento vegetativo, la inducción de la autólisis, el metabolismo secundario, y la

generación espacio-temporal de los módulos celulares del conidióforo han sido identificados en las dos últimas décadas (Adams *et al.*, 1998, Fischer & Kues, 2006). Algunas de las funciones que estos factores llevan a cabo, así como las interrelaciones que tienen lugar entre ellos, empiezan a conocerse.

La emergencia al aire puede considerarse el estímulo principal e imprescindible para que ocurra la conidiación (Morton, 1961). Así, se sugiere que la exposición al aire de un micelio es la señal que activa el proceso morfogénico. Evidencias obtenidas en múltiples trabajos han planteado que el estímulo del aire se detecta a través de un metabolito de carácter endógeno. En *Penicillium cyclopium* se observó que tras la exposición al medio aéreo, el metabolito se acumularía en la superficie de las hifas, alcanzando una concentración suficiente como para provocar una respuesta conidante (Roncal & Ugalde, 2003).

Una vez activado el proceso, estímulos como la exposición a la luz o los niveles de oxilipinas que se acumulan en fase gaseosa modulan la producción de conidióforos (Bayram *et al.*, 2010, Herrero-García *et al.*, 2011). Estas señales no son suficientes para activar la esporulación por sí solas, pero sin embargo son capaces de modular la respuesta que activa la producción de conidióforos generados tras la exposición aérea del hongo.

En el caso de *Aspergillus nidulans*, se ha descrito la necesidad de irradiación con luz roja (máximo efecto inductor a 680nm) y/o luz azul (máximo efecto inductor a 450nm) para estimular la conidiación en hifas aéreas (Bayram *et al.*, 2010). Se había descrito que el efecto biológico de la luz no es manifiesto en periodos de exposición menores a 15-30 min (Mooney & Yager, 1990). Sin embargo estudios recientes han sugerido que la exposición a la luz activa de manera inmediata la respuesta a dicho estímulo (Rodríguez-Romero, comunicación personal).

Las oxilipinas de 8 carbonos (8CO) son compuestos volátiles endógenos que el hongo emite al medio y que ejercen una función moduladora en la producción de esporas. La emergencia al aire incrementa los niveles de oxilipinas en el medio hasta obtener unos niveles capaces de estimular la esporulación incluso en condiciones de cultivo en oscuridad (Herrero-García *et al.*, 2011). Sin embargo no causan ningún efecto en cultivos sumergidos, lo cual indica que las oxilipinas no son suficientes para suplantar el estímulo de la emergencia al aire.

Al margen de los estímulos asociados a la emergencia del aire, estreses ambientales como la ausencia de fuente de carbono o nitrógeno o el estrés osmótico son capaces de activar el proceso de desarrollo en un medio sumergido (Skromne *et al.*, 1995, Etxebeste *et al.*, 2008). Estos resultados llevaron a plantear la posibilidad de que la conidiación también surgiera como respuesta ante algunas situaciones de estrés, e incluso se describió la existencia de osmosensores involucrados en la señalización de la conidiación (Virginia *et al.*, 2000, Furukawa *et al.*, 2002). Es posible que los estreses puedan suplantar el estímulo de la emergencia al aire generando un cortocircuito a la ruta principal de inducción utilizando otros elementos u otra ruta señalizadora.

Los mecanismos de respuesta exactos a los estímulos ambientales mencionados no se han establecido claramente. En lo que a la emergencia al aire se refiere se sugiere que es detectada mediante un primer metabolito relacionado con este estímulo. La proteína FluG está asociada con la producción de ese metabolito extracelular no identificado que presumiblemente se acumula en las hifas aéreas y así señala la emergencia a la atmósfera (Lee & Adams, 1996). Este factor es específico y necesario para la correcta conidiación y el estudio de mutantes *fluG*⁻ demostró que no forman conidióforos. La administración del factor extracelular a mutantes *fluG*⁻ es suficiente para restituir la producción de conidióforos complejos (Soid-Raggi *et al.*, 2006, Etxebeste *et al.*, 2008).

El factor de señalización extracelular dependiente de FluG ejerce de manera aún indeterminada efectos que son parte de la respuesta de conidiación. Por un lado revierte el efecto represor sobre la conidiación (promoviendo el crecimiento vegetativo) ejercido por el factor de transcripción SfgA (factor de transcripción tipo dedo de zinc tipo Zn(II)₂Cys₆; (Seo *et al.*, 2006)). A su vez, FlbA, un regulador de la señalización de proteínas G (Lee & Adams, 1996, Yu, 2006), es también activado, el cuál aumenta la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α de una proteína G heterotrimérica, FadA, que señala el crecimiento vegetativo de las hifas (Yu, 2006). Esto promueve la unión a GDP de FadA, inhibiendo la disociación de las subunidades β y γ , SfaD y GpgA, respectivamente (Rosén *et al.*, 1999, Seo *et al.*, 2005), bloqueando el crecimiento vegetativo e induciendo la conidiación (Fig I6; (Yu, 2006)). Aunque la forma de acción de estos dos procesos complementarios no ha sido analizada específicamente, es posible que ambos participen simultáneamente, e inmediatamente después de la recepción del estímulo inductor. La señal extracelular del factor FluG es

aparentemente requerida para la activación de un número de factores de transcripción, que a su vez regulan la producción del conidióforo y que se van a describir en el siguiente apartado. La ruta por la que se lleva a cabo esta activación no se conoce hasta la fecha.

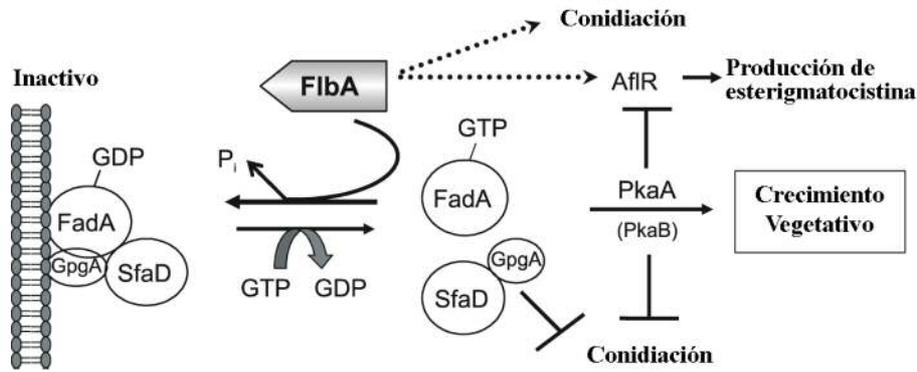


Fig I6. Regulación del desarrollo y producción de esterigmatocistina mediada por proteína G-regulador. En condiciones de esporulación FlbA aumenta la actividad GTPasa intrínseca de FadA, promoviendo la unión a GDP. Esto promueve la formación de la proteína G heterotrimérica, inhibiendo el crecimiento y activando la conidiación. Sin embargo, en condiciones no inductoras de conidiación la unión GTP-FadA produce la disociación del complejo heterotrimérico, inhibiendo la conidiación y activando el crecimiento vegetativo. La señalización de crecimiento vegetativo mediada por FadA es traducida en parte por PkaA (proteína quinasa A primaria). PkaB es la subunidad catalítica de la PKA secundaria (de apoyo). Modificado a partir de Yu, 2006.

La exposición a la luz también activa una respuesta relacionada con la conidiación. Entre los reguladores de la señalización de la luz destaca la proteína VeA, la cual ejerce un papel importante en la transducción de dicha señal (Fig I7; (Calvo, 2008, Bayram *et al.*, 2010, Rodríguez-Romero *et al.*, 2010)). Diferentes estudios han demostrado que VeA integra tanto la señal de luz roja (Mooney & Yager, 1990) como de luz azul (Yager *et al.*, 1998, Purschwitz *et al.*, 2008) y hay evidencias que apoyan una integración de señales correspondientes al estrés osmótico (Azuma *et al.*, 2007) y nutricional (Atoui *et al.*, 2010) de la hifa. La respuesta de VeA incluye también la regulación de metabolitos secundarios (Spröte & Brakhage, 2007) y la biosíntesis de manoproteínas (Jeong *et al.*, 2003), así como la regulación de los ciclos de reproducción asexual y sexual (Calvo, 2008, Bayram *et al.*, 2010). Sin embargo, no se conoce exactamente cual de ellos está directamente relacionado con la conidiación.

Los papeles reguladores exhibidos por VeA provienen de su capacidad para cambiar su localización celular y para formar diversos complejos proteicos (Stinnett *et al.*, 2007, Bayram *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2009, Rodríguez-Romero *et al.*, 2010). En el crecimiento de hifas vegetativas alojadas en un substrato semisólido, VeA se acumula en los núcleos en ausencia de luz. Sin embargo, la iluminación impide el transporte al núcleo (Stinnett *et al.*, 2007), el cual está mediado por la importina- α (Araújo-Bazán *et al.*, 2009). Aunque la función específica que ejerce VeA en la conidiación es desconocida hay evidencias que apoyan que la proteína nuclear VeA inhibe la conidiación, pudiendo reprimir la acción de activadores del proceso, y es conocido que la migración desde el núcleo al citoplasma es necesaria para que ocurra la conidiación. Esto se lleva a cabo probablemente mediante interacciones específicas con un número determinado de proteínas reguladoras (Fig I7; (Bayram *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2009)). El receptor histidina quinasa de luz roja tipo fitocromo FhpA y los receptores de luz azul “white-collar” LreA y LreB son tres de los componentes del complejo VeA y enlazan la respuesta a la luz roja y azul con el desarrollo (Purschwitz *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2009). El control del metabolismo secundario ocurre mediante la interacción VeA-LaeA-VelB (Bok & Keller, 2004, Bayram *et al.*, 2008) y otros interactores identificados más recientemente como son VipA, VipB y VipC, aunque las funciones de estos últimos todavía no se han determinado (Bayram *et al.*, 2008, Calvo, 2008).

Además de la ya mencionada respuesta a la luz, VeA también podría relacionar la respuesta de la hifa con la emergencia al aire. Estudios previos mostraron que la mutación *veA1*, la cual causa que VeA se mantenga en el citoplasma sin ser transportada al núcleo (Stinnett *et al.*, 2007) permitiendo así que ocurra el desarrollo asexual en oscuridad, puede ser suprimido por mutaciones en el *locus fluG* (Mooney *et al.*, 1990). Tradicionalmente todos los trabajos realizados acerca de la conidiación en *A. nidulans* se han llevado a cabo con cepas mutantes *veA1*. Los trabajos realizados en esta tesis se han realizado de forma similar, especificando en los casos en los que se ha utilizado una cepa con un alelo *veA* silvestre.

La conexión molecular exacta entre los factores VeA y FluG no ha sido explorada en profundidad (Fig I7) y la existencia de una interacción física entre los factores que explique la conexión entre FluG y VeA es algo que hoy en día no se ha confirmado por métodos moleculares.

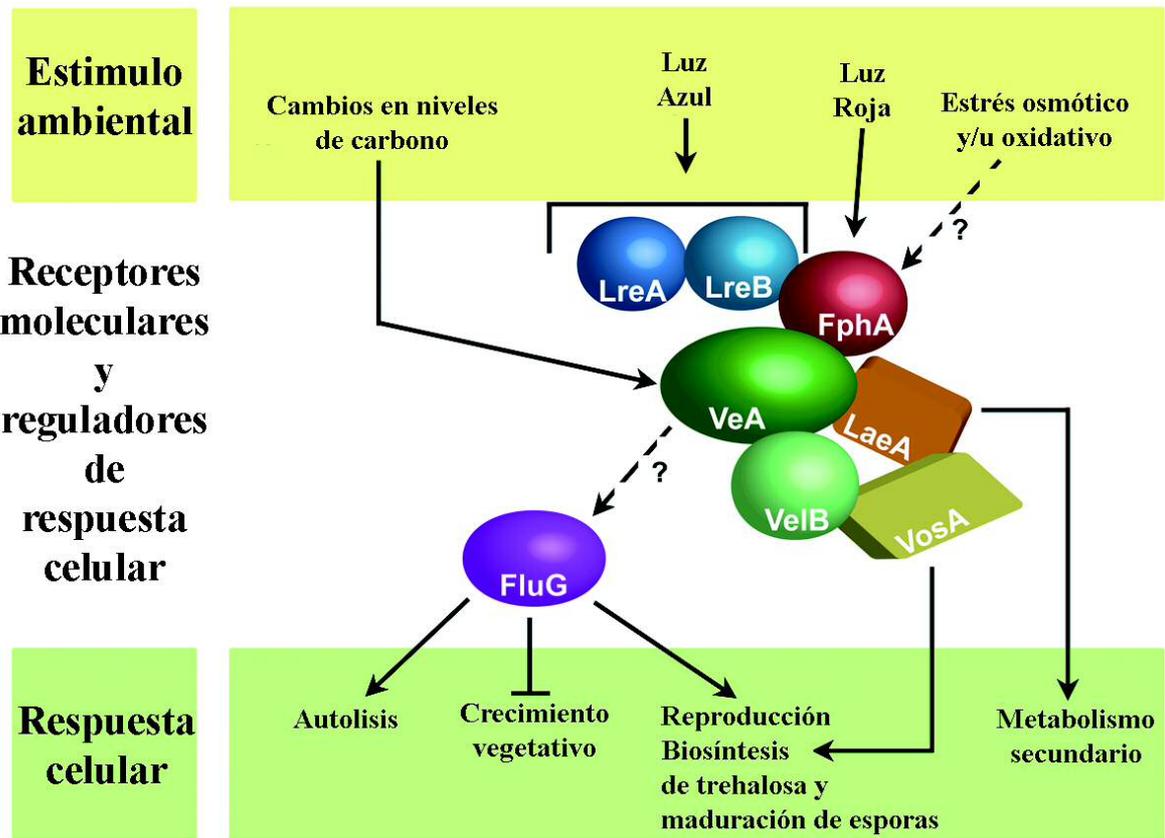


Fig 17. Funciones tanto sensorial y como reguladora del complejo en el que participa VeA. Los estímulos ambientales (franja amarilla) provocan la variación en la localización celular de VeA (no mostrado) y las interacciones con receptores y reguladores específicos (franja blanca) para coordinar múltiples procesos celulares (franja verde), incluyendo el desarrollo asexual.

En resumen, el conjunto de las evidencias experimentales disponibles indican que la emergencia al aire es el estímulo ambiental principal. Sin embargo, una vez activado el proceso, la luz, las oxilipinas o incluso algún otro estímulo desconocido hasta ahora podrían modular nuevamente este proceso dando lugar a una respuesta de manera combinada, que resultaría en una mayor o menor producción de conidióforos.

3.2. Inicio de la formación del conidióforo

La búsqueda de nuevos factores involucrados en la ruta principal de conidiación y que ejercieran su función aguas abajo del estímulo del aire y los efectos moduladores de la luz y las oxilipinas, reveló una serie de proteínas cuyos mutantes eran aconidiales, pero podían recuperar la capacidad de esporular en contacto con una

cepa silvestre. Estos mutantes, a su vez, eran capaces de complementar extracelularmente la deficiencia en el metabolito de señalización relacionado con FluG, y por tanto provocar la reversión del fenotipo aconidial de mutantes *fluG*⁻ en las zonas de contacto (Lee & Adams, 1996). Estos datos indicaron la existencia de, al menos, una segunda señal, además de la señal dependiente de FluG, que actuaría supuestamente tras la acción del primer factor. El bloqueo causado en el proceso por mutaciones en estos genes se podría teóricamente revertir con la adición de ese segundo metabolito, aunque este no ha sido aislado hasta la fecha.

Puesto que estos reguladores se encontraban presentes en hifas vegetativas fueron llamados factores de inducción temprana, o con la denominación **upstream developmental activators (UDAs)** (Yu *et al.*, 2006)). Los UDAs responden a la señal dependiente de FluG e integran la respuesta en un programa de desarrollo coordinado (Ni *et al.*, 2010). Las funciones que se han atribuido a los UDAs incluyen la inhibición del crecimiento vegetativo, la regulación del desarrollo del conidióforo y por último, la activación de una ruta reguladora que solapa con ellas y se expresa exclusivamente en el conidióforo y controla la producción de fiálidas y conidias (también conocida como ruta central del desarrollo o **central developmental pathway, CDP**; (Fischer & Kües, 2006, Etxebeste *et al.*, 2009a)). El primer gen que corresponde a dicha ruta central es *brlA*, considerado el elemento central o gen maestro de la CDP. Se identificaron un total de 5 genes que tenían este rasgo común y componen los UDAs: *flbA* (descrito en el apartado anterior), *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (Wieser *et al.*, 1994).

Los UDAs fueron parcialmente caracterizados en los años 90 (Adams *et al.*, 1998). A pesar de que todos participaban en la producción de un segundo metabolito y activaban la ruta central, las evidencias obtenidas sugerían que podrían activar la CDP ejerciendo sus funciones desde diferentes rutas paralelas. Su posición relativa en la ruta de inducción temprana fue definida en base a experimentos de epistasia, tales como estudio del fenotipo de los mutantes simples y dobles y también en base a experimentos de sobreexpresión (Wieser *et al.*, 1994, Wieser & Adams, 1995). De esta manera se planteó que *flbE*, *flbD* y *flbB* actuaban en una misma ruta y en este orden; que *flbC* actuaba paralelamente a ellos, y se situó a *flbA* en una tercera ruta, actuando sobre la proteína G de la manera descrita en el apartado anterior (Yu *et al.*, 2006).

Los estudios realizados también aportaron datos sobre las posibles funciones que podrían ejercer estas proteínas. Se describió que tanto FlbC como FlbD eran factores de transcripción del tipo dedos de zinc clásicos C_2H_2 (Adams *et al.*, 1998) y cMyb (Wieser & Adams, 1995), respectivamente. Sobre FlbD también se conocía que se expresaba durante el crecimiento vegetativo y se propuso que su expresión estaría regulada a nivel post-transcripcional, pero esto no pudo ser confirmado. Para FlbE, en cambio, no se hallaron dominios funcionales conocidos en la secuencia peptídica (Wieser *et al.*, 1994, Adams *et al.*, 1998). Sin embargo, el fenotipo de los mutantes *flbE* ponía de manifiesto que su actividad es imprescindible para una correcta inducción de la conidiación.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio previamente a esta tesis doctoral se localizaron y caracterizaron en el genoma dos mutaciones en diferentes *loci* que provocaban fenotipos aconidiales indistinguibles. Las mutaciones responsables de estos fenotipos se localizaron en los genes *flbE* y *flbB* (Etxebeste *et al.*, 2008). Se realizaron trabajos para aclarar el papel que ejerce FlbB en el proceso. Se describió como un factor de transcripción tipo bZip (basic ZIPper) que contiene dominios similares a factores del tipo AP-1, una familia de bZips que participa en la ruta señalizadora del estrés oxidativo y que activa la correspondiente respuesta celular (Castillo *et al.*, 2002, Asano *et al.*, 2007, Etxebeste *et al.*, 2009a). Uno de los puntos destacables de este factor de transcripción resultó ser su localización celular, ya que se detectó tanto en el ápice de las hifas vegetativas, en o cerca del *Spitzenkörper*, así como en el núcleo más apical (Etxebeste *et al.*, 2008). Esta localización sugirió la posibilidad de que el FlbB apical pudiera ejercer un papel sensorial (Etxebeste *et al.*, 2009a). En cuanto a FlbB nuclear, durante la mitosis, cuando la envoltura nuclear se desensambla parcialmente (De Souza & Osmani, 2007), FlbB se dispersa a lo largo del citoplasma (Etxebeste *et al.*, 2009a). El final de la mitosis supone el reensamblaje de la envoltura nuclear y la importación de cierta fracción de FlbB en los dos núcleos hijos (Etxebeste *et al.*, 2009a). Si esta fracción importada corresponde a FlbB apical, proporcionando así al núcleo la información de las condiciones apicales de la hifa después de cada ciclo mitótico, reforzando así la hipótesis de que ejerce una función sensorial, queda por confirmar. Otro aspecto a recalcar es que bajo condiciones de conidiación, FlbB se distribuye en todos los núcleos de las hifas aéreas (Etxebeste *et al.*, 2009a).

En resumen, los factores *UDA*, que están presentes en hifas vegetativas, responden a las señales intracelulares derivadas de estímulos para generar una respuesta que lleva al desarrollo del conidióforo, y sus funciones convergen en una segunda señal intracelular imprescindible para la conidiación.

3.3. Finalización del proceso: formación de fiálidas y conidiogénesis

La activación de *brlA*, que codifica un factor de transcripción tipo dedos de zinc clásicos C_2H_2 , al finalizar la fase de elongación del tallo del conidióforo marca la transición entre la regulación de *UDA* y de la *CDP* (Mah & Yu, 2006). La complejidad del mecanismo de regulación de *brlA* queda en evidencia con la síntesis de dos transcritos del locus, *brlA α* y *brlA β* , codificando esta última a una proteína con 23 amino ácidos adicionales en el extremo N terminal. Además, los mutantes $\Delta brlA$, *brlA α* y *brlA β* muestran defectos morfológicos que señalan las diversas funciones en diferentes etapas del desarrollo del conidióforo (Fischer & Kues, 2006). En el mutante $\Delta brlA$, los tallos se elongan excesivamente, mientras en los mutantes de *brlA β* aparecen conidióforos defectuosos, de los cuales parten unos segundos conidióforos también defectuosos. En el caso de los mutantes *brlA α* , el desarrollo progresa pero los conidios no se producen (Fig I8, (Fischer & Kues, 2006)). También es conocido que la expresión de *brlA α* está regulada por *brlA β* (Barton & Prade, 2008). Estas características son las que sugieren que cada uno de los transcritos de *brlA* ejerce funciones específicas en diferentes etapas del desarrollo, pero la manera precisa en la que las diferentes formas de BrlA pueden participar en el control de la producción del conidióforo no es conocido hoy en día.

BrlA controla la expresión de diferentes genes específicos de la conidiación que se activan aguas abajo de manera jerárquica, sin la participación de los genes *UDA*. De echo, la sobreexpresión inducible de este factor de transcripción en hifas vegetativas da como resultado la producción de conidias desde la punta de la hifa, emulando la funcionalidad de una fiálida (Sewall, 1994). El primer factor conocido regulado por BrlA es AbaA, un factor de transcripción tipo ATTS que regula da diferenciación de fiálidas (Sewall *et al.*, 1990a, Andrianopoulos & Timberlake, 1991).

AbaA activa la expresión de una amplia gama de genes, incluyendo *wetA*, que es requerido para la pigmentación e integridad de los conidios (Sewall *et al.*, 1990b).

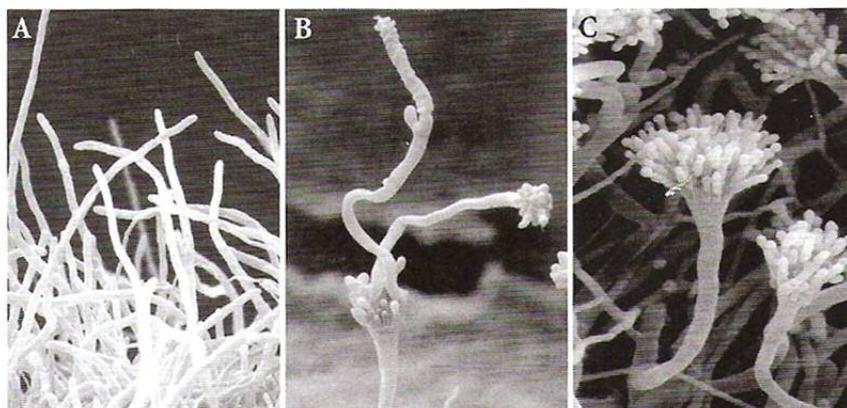


Fig 18. Mutantes del gen *brlA*. A) En mutantes nulos de *brlA* solamente se forman tallos elongados. B) En mutantes de *brlA β* se forman conidióforos secundarios defectuosos a partir de vesículas de conidióforos primarios defectuosos. C) En mutantes de *brlA α* el proceso de desarrollo se lleva a cabo sin producir conidias. Modificado a partir de Fischer y Kües, 2006.

Se considera que *brlA*, *abaA* y *wetA* comprenden el eje central de la ruta central o *CDP*, y que las relaciones reguladoras que hay entre ellas gobiernan esta ruta (Ni *et al.*, 2010). BrlA dirige la expresión de *abaA* y *wetA*, pero también BrlA regula su propia expresión en las fases de desarrollo de métula y fiálida (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Esta autorregulación podría modular un bucle de retroalimentación negativo desde AbaA a *brlA*, porque se sugirió que AbaA ejerce una represión directa de la expresión *brlA* en niveles bajos, aunque en altos niveles es un papel positivo (Aguirre, 1993). Actualmente no hay ninguna evidencia de que WetA tenga un papel en la regulación de *brlA* (Marshall & Timberlake, 1991). Los factores de transcripción auxiliares StuA y MedA modulan la actividad espacial y temporal, respectivamente, de los factores de la *CDP* (Miller *et al.*, 1992, Miller *et al.*, 1993, Busby *et al.*, 1996). Ambas proteínas pueden ejercer otras funciones, ya que StuA se expresa también en hifas vegetativas y la expresión de MedA empieza después de la inducción de la conidiación y se mantiene durante todo el ciclo asexual (Busby *et al.*, 1996).

VosA es otro factor de transcripción que actúa aguas abajo de BrlA que es esencial para la maduración de esporas y la biogénesis de trealosa, un azúcar que ejerce la función de almacenaje de energía y estabiliza proteínas y membranas (Ni &

Yu, 2007). VosA se expresa específicamente durante la formación de esporas y ejerce un doble papel activando *wetA* para completar la conidiogénesis y también reprimiendo a *brlA*, completando así el ciclo de BrlA. Curiosamente, en trabajos recientes se ha mostrado que VosA está implicado en estadios muy tempranos del desarrollo asexual, interaccionando con VeA mediante VelB (Bayram *et al.*, 2008), aunque el mecanismo molecular aun se desconoce. VosA también es importante en la producción de las esporas sexuales (ascoesporas).

En resumen, tras la regulación de los estadios tempranos regulados por los *UDA*, entran en acción los integrantes de la *CDP* en el periodo que comprende desde la formación de vesículas hasta la formación de esporas.

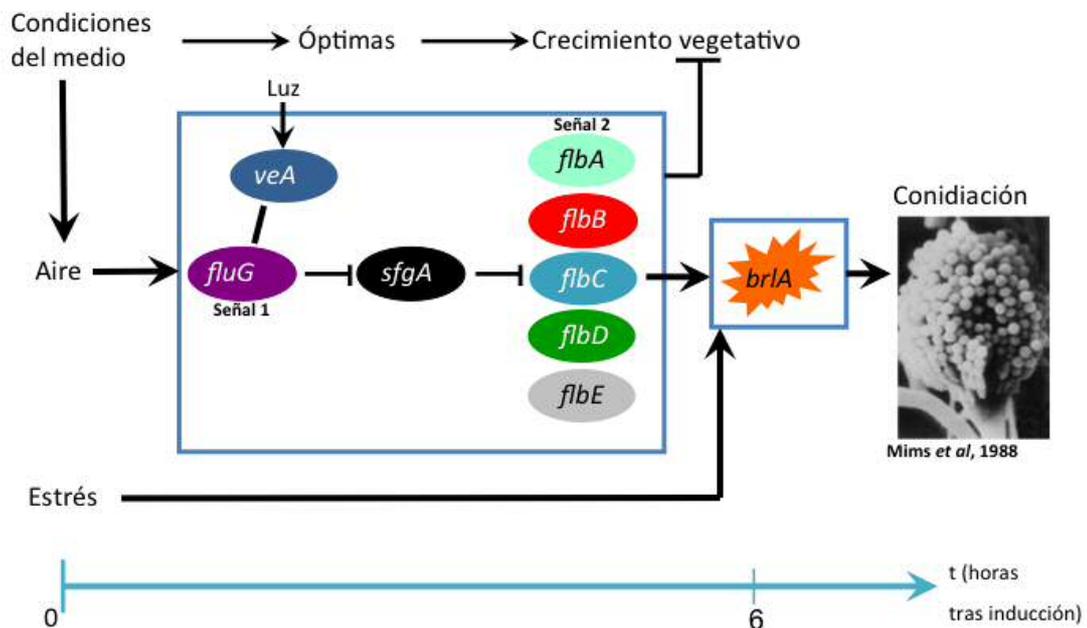


Fig I9. Modelo de control del crecimiento y desarrollo de *A. nidulans*.

OBJETIVOS

La presente tesis parte de la identificación y posterior caracterización del factor de transcripción FlbB en la inducción de la conidiación en *A. nidulans*. El conocimiento de otras proteínas de inducción temprana previamente descritas, llevó a estudiar la relación de éstas con FlbB. Los objetivos generales de este proyecto se resumen de la siguiente manera:

1. Identificación de proteínas de inducción temprana que forman parte del complejo señalizador en el que participa FlbB.
2. Caracterización del factor de inducción temprana FlbE: análisis de la secuencia protéica, descripción fenotípica, relación transcripcional con FlbB y estudio de la interacción entre ambas.
3. Estudio de las relaciones transcripcionales entre los factores de regulación FlbB/FlbD/FlbC y su papel en el mecanismo de activación del gen maestro *brlA*
4. Revisión del modo de acción de los UDAs en la regulación de la conidiación de *A. nidulans*.

**MATERIALES Y
MÉTODOS**

1. Cepas y oligonucleótidos utilizados

Las cepas y los oligonucleótidos utilizados en el trabajo realizado durante esta tesis se presentan en las siguiente tablas, M&M1 y M&M2 respectivamente.

Cepa	Genotipo	Fuente
FGSCA4	<i>Wild type (veA⁺)</i>	(Polley & Caddick, 1996)
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	(Käfer, 1965)
FGSC A68	<i>suA1adE20; yA2; adE20; acrA1;</i> <i>phenA2; pyroA4; lysB5; sB3;</i> <i>nicB8; riboB2; veA1</i>	(Käfer, 1965)
FGSC A283	<i>suA1adE20; yA2; adE20; acrA1;</i> <i>galA1; pyroA4 (ssb⁺); facA303;</i> <i>sB3; nicB8; riboB2; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
TTA127.4	<i>ΔfluG::trpC; pabaA1; yA2; veA1</i>	(Lee & Adams, 1994)
RMSO11	<i>ΔargB::trpCΔB; trpC801;</i> <i>pabaA1; yA2; veA1</i>	(Stringer <i>et al.</i> , 1991)
GR5	<i>pyrG89; pyroA4; wA; veA1</i>	(Waring <i>et al.</i> , 1989)
MAD782	<i>pyrG89; pabaA1; biA1; yA2; veA1</i>	Eduardo Espeso (CIB-CSIC, Madrid, Spain)
TN02A3	<i>ΔnkuA::argB; argB2; pyrG89;</i> <i>pyroA4; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
TN02A21	<i>ΔnkuA::argB; argB2; riboB2;</i> <i>pyroA4; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
TN02A25	<i>ΔnkuA::argB; argB2; pyrG89;</i> <i>riboB2; pabaB22; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
WIM126	<i>pabaA1;yA2;veA⁺</i>	(Butnick <i>et al.</i> , 1984)
BD13 (<i>flbE001</i>)	<i>flbE001; biA1, veA1</i>	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD101	<i>flb001; argB2; pyrG89;</i> <i>yA2; pabaA1; VeA1</i>	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD143	<i>ΔnkuA::argB; argB2; ΔflbE::pyrG;</i> <i>pyrG89; pyroA4; veA1</i>	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)

BD160	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD161	$\Delta flbE::pyrG$; $pyrG89$; $pabaA1$, $pyroA4$; $argB2$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD167	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbB::gfp/pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	(Etxebeste <i>et. al.</i> , 2008)
BD176	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbB::gfp/pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD177	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbB::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD178	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD186 (<i>flbE100</i>)	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD187	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG89$; $\Delta flbB::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD188	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD189	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::flbE::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD191	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD192	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbE::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD193	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbB::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD194	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbB::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)

BD195	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbB::ribo$ $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbE::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD197	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $\Delta flbD::pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD198	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbD::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD200 (<i>flbE101</i>)	$flbE101$; $\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD201 (<i>flbE102</i>)	$flbE102$; $\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD202 (<i>flbE103</i>)	$flbE103$; $\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG$; $pyrG89$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD208	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbE::gfp/pyrG89$; $pyrG89$; $\Delta flbD::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD209	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $flbB::gfp/pyrG89$; $pyrG89$; $\Delta flbD::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD210	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbE::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbD::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD211	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbB::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbD::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD224	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::yfpn::flbB::pyrG$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD225	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::yfpn::flbE::pyrG$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD226	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::yfpn::flbB::pyrG$; $alcA(p)::yfpn::flbE::pyrG$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2009)

BD237	$\Delta nkuA::argB; argB2; pyrG89; DflbC::pyrG;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyroA4; veA1$	
BD244	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbA::gfp/pyrG; pyrG89;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyroA4; veA1$	
BD245	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbC::gfp/pyrG; pyrG89;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyroA4; veA1$	
BD246	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbD::gfp/pyrG;$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; pyroA4; veA1$	
BD247	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbA::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; pyroA4; veA1$	
BD249	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbC::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; pyroA4; veA1$	
BD250	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbD::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; pyroA4; veA1$	
BD253	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbC::gfp/pyrG; pyrG89;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$DflbB::ribo; riboB2; pabaB22; pyroA4; veA1$	
BD254	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbD::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; \Delta flbB::ribo; riboB2; pabaB22;$	
	$pyroA4; veA1$	
BD256	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbC::gfp/pyrG; pyrG89;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$DflbE::ribo; riboB2; pabaB22; pyroA4; veA1$	
BD257	$\Delta nkuA::argB; argB2; flbD::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; \Delta flbE::ribo; riboB2; pabaB22;$	
	$pyroA4; veA1$	
BD259	$\Delta nkuA::argB; argB2 flbB::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; DflbC::pyrG; pyroA4; veA1$	
BD260	$\Delta nkuA::argB; argB2 flbE::CherryRed/pyroA;$	Este estudio (Kwon <i>et al.</i> , 2010)
	$pyrG89; DflbC::pyrG; pyroA4; veA1$	
BD271	$\Delta nkuA::argB; argB2; pyrG89; \Delta flbD::ribo;$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
	$riboB2; pabaB22; alcA(p)::flbD::pyroA*;$	
	$pyroA4; veA1$	

BD272	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbD::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbB::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD273	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $\Delta flbD::ribo$; $riboB2$; $pabaB22$; $alcA(p)::flbE::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD274	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $\Delta flbD::pyrG$; $\Delta flbB::ribo$; $pyrG89$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD275	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $\Delta flbD::pyrG$; $\Delta flbE::ribo$; $pyrG89$; $riboB2$; $pabaB22$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD277	$\Delta nkuA::argB$; $argB2$; $pyrG89$; $alcA(p)::brlA\alpha\beta::pyroA^*$; $pyroA4$; $veA1$	Este estudio (Garzia <i>et al.</i> , 2010)

Tabla M&M1.: Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en el presente trabajo.

Oligo	Secuencia (5' - 3')	Objetivo
pRG3up	GAA TTC GAG CTC GGT ACC	Secuenciación de inserto de pRG3
pRG3 down	AAG CTT GCA TGC GCG GCC	Secuenciación de inserto de pRG3
AN0721-1	CGC AAA TGC AGA CAA GG	Secuenciación <i>flbE</i>
AN0721-2	CCA TCT TGT CTG ATG GCC	Secuenciación <i>flbE</i>
flbE-GSP1	GCT GCA AGG GGT CGC AGA ACG AAC C	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i>
flbE-GSP1*	GGA ATC CGG GTC TAC ATC GTC TTG CAC AAC C	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i>
flbE-GSP2	CGA AAA CGT TTT GTT GAA GAA TCG CGT TAA TGT CTC	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i>
flbE-GSP3	TGA TTG CTG TAC GAG TTA TAT TAC GAC TGA TGA	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i> y $\Delta flbE$
flbE-GSP4	GCT TAC CTG CTG GAT CTC CTG CCG GTA CTT AGG	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i> y $\Delta flbE$

flbE-PP1	GCA ACA AAT TCG GCT GTT GGG CTC AGG	Obtención <i>gfp::flbE</i> y Δ <i>flbE</i>
flbE-PP2	CAT GGT AAG GCG ACG ACG GCC CTC	Obtención <i>gfp::flbE</i> y Δ <i>flbE</i>
flbE-GFP1	GAG ACA TTA ACG CGA TTC TTC AAC AAA ACG TTT TCG GGA GCT GGT GCA GGC GCT GGA GCC	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i>
flbE-GFP2	TCA TCA GTC GTA ATA TAA CTC GTA CAG CAA TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Obtención <i>flbE::gfp/pyrG</i> y Δ <i>flbE</i>
flbE-SMP1	GAG GGC CGT CGT CGC CTT ACC ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Obtención Δ <i>flbE</i>
<i>alcA</i> (p) sens	GGG GTA CCG AAC TAG TGG ATC TGC GAT GC	Extremo 5' de <i>alcA</i> (p)
<i>alcA</i> (p) antis	GCT CAG CTG GAA TTC CTG C	Extremo 3' de <i>alcA</i> (p)
<i>flbE</i> over sens	GGA ATT CCA TGC CAG TCT ACA TGC TC	Amplificación 5' <i>flbE</i> sobreexpresión y primer sentido <i>flbE</i> para sonda
<i>flbE</i> over antis	GGA ATT CCG TAC AGC AAT CAC GAA AAC G	Amplificación 3' <i>flbE</i> sobreexpresión y primer antisentido <i>flbE</i> para sonda
<i>flbB</i> over sens	CGG GAT CCC GCC ATG ACT TCG ATC AGT AGT AGG	Amplificación 5' <i>flbB</i> sobreexpresión y primer sentido <i>flbB</i> para sonda
<i>flbB</i> over antis	GGA ATT CCT GTC AGG TCA TGA ATA CAT CG	Amplificación 3' <i>flbB</i> sobreexpresión y primer antisentido <i>flbB</i> para sonda
<i>flbE</i> cDNA1	GTC CAG ACT CAT TAC CAG CG	<i>flbE</i> cDNA 5' amplificación
<i>flbE</i> cDNA2	CAT TCC CAA TGT TTG GGG	<i>flbE</i> cDNA 3' amplificación
<i>flbB</i> cDNA1	GGT CGC ATT TCA ACC TCC	<i>flbB</i> cDNA 5' amplificación
<i>flbB</i> cDNA2	AGT AAA TGG GAA ATA AGG GC	<i>flbB</i> cDNA 3' amplificación
<i>brlA</i> probe sens.	CCA TGC AGA TCA GCC CTC	Primer sentido <i>brlA</i> para sonda

<i>brlA</i> probe antis.	CGG AAT TCG TAA ACT GAA CGG TGC TC TGG	Primer antisentido <i>brlA</i> para sonda
<i>ancA</i> probe sens.	CGG AAT TCG ATC GGT ATG GGT CAG AAG G	Primer sentido <i>ancA</i> para sonda
<i>ancA</i> probe antis.	CGG AAT TCG ATG TTG CCG TAC AGA TCC	Primer antisentido <i>ancA</i> para sonda
<i>flbE</i> dhy1	GGA ATT CAT GCC AGT CTA CAT GCT C	Primer sentido <i>flbE</i> para doble híbrido
flbD-GSP1	GGT GGA ATG GCA ACA TGA AC	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado
flbD-GSP2	GTT CAA GAG GTT GTC GAG GC	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado
flbD-GSP3	TGA ACG ATC ACA CGA CTC TCT T	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado
flbD-GSP4	GGC AGG CGT TAC TGT ATA CGT	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado
flbD-PP1	CGA CTC CAT GAC CAC ATT CC	Obtención cepa Δ <i>flbD</i>
flbD-PP2	CAT TTG CGA AAC TGT GTT GG	Obtención cepa Δ <i>flbD</i>
flbD-GFP1	GCC TCG ACA ACC TCT TGA ACG GAG CTG GTG CAG GCG CTG GAG CC	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado
flbD-GFP2	AAG AGA GTC GTG TGA TCG TTC AGT CTG AGA GGA GGC ACT GAT GCG	Obtención cepa <i>flbD</i> etiquetado y Δ <i>flbD</i>
flbD-SMPpyrG1	CCA ACA CAG TTT CGC AAA TGA CCG GTC GCC TCA AAC AAT GCT CT	Obtención cepa Δ <i>flbD</i>
flbD-SMPribo1	CCA ACA CAG TTT CGC AAA TGA AGA GGC CGT TCA GGA GTC TGG	Obtención cepa Δ <i>flbD</i>
flbD-SMPribo2	AAG AGA GTC GTG TGA TCG TTC ACA GAA CGT TTG CGC TGC AGA ACC	Obtención cepa Δ <i>flbD</i>
flbD alcA1	CGG GAT CCC GAG TTT CGC AAA TGG CTC C	Amplificación 5' <i>flbD</i> sobreexpresión y primer sentido <i>flbD</i> para sonda

flbD alcA2	GGA ATT CCG TGT GAT CGT TCA GTT CAA GAG G	Amplificación 3' <i>flbD</i> sobreexpresión y primer antisentido <i>flbD</i> para sonda
flbD(p)1 sense	GGA GCT GAC AGT TGT CGG AG	Fragmento AB promotor <i>flbD</i> primer sentido para EMSA y ChIP
flbD(p)1 antis	CGG GTC TGG TGT CTC CTG	Fragmento AB promotor <i>flbD</i> primer antisentido para EMSA y ChIP
flbD(p)2 sense	CGG ACC CAC TCA GGA GAC AC	Fragmento CD promotor <i>flbD</i> primer sentido para EMSA y ChIP
flbD(p)2 antis	GGC TTG TCT ATG GGT CCA GC	Fragmento CD promotor <i>flbD</i> primer antisentido para EMSA y ChIP
flbD(p)3 sense	CCA AGA CAA ATT GAA CGA GTC G	Fragmento EF promotor <i>flbD</i> primer sentido para EMSA y ChIP
flbD(p)3 antis	CCT CCG ACA ACT GTC AGC TCC	Fragmento EF promotor <i>flbD</i> primer antisentido para EMSA y ChIP
blrA(p)G sense	CTC GAC TGA TAC GGC AAA GGC	Fragmento G promotor <i>blrA</i> primer sentido para EMSA y ChIP
blrA(p)G antis	ACG GCC CTG GAC CTG TCC	Fragmento G promotor <i>blrA</i> primer antisentido para EMSA y ChIP
gabA(p)PacC 1	GGA CTC GCG TGT TTC GC	Fragmento sitio union PacC promotor <i>gabA</i> primer sentido para ChIP
gabA(p)PacC 2	GCA AGG CCC TTC TCT TCC	Fragmento sitio union PacC promotor <i>gabA</i> primer antisentido para ChIP
GST-flbD	GG GAT CCC GCA TGG CTC	Dominio cMyb de <i>flbD</i> 5' amplificación para EMSA
cMyb sense	CAA CAC ACC GTC	
GST-flbD	GCG AAT TCA GGG CGT TCT	Dominio cMyb de <i>flbD</i> 3' amplificación para EMSA
cMyb antisense	GA GTG TGG	
flbC-PP1	GGA AAG GGC AGG TTG TGG	Obtención cepa $\Delta flbC$
flbC-PP2	CAT TGA GGA TAG TCG TTT TGA AAG	Obtención cepa $\Delta flbC$
flbC-GSP3	TAA TCG TTT CAA TCG ACC TGC	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado y $\Delta flbC$
flbC-GSP4	TAT CGT CAC TAC CGT CAT CCG	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado y $\Delta flbC$

flbC-SMP _{pyrG1}	CTT TCA AAA CGA CTA TCC TCA ATG ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT	Obtención cepa $\Delta flbC$
flbC-GFP2	GCA GGT CGA TTG AAA CGA TTA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado y $\Delta flbC$
flbC-GSP1	CCA GCA TCC GCA CCA CAG TCA ACC	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado
flbC-GSP2	CTC TTC GTC ATC GCC TGA ACC TCC C	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado
flbC-GFP1	GGG AGG TTC AGG CGA TGA CGA AGA GGG AGC TGG TGC AGG CGC TGG AGC C	Obtención cepa <i>flbC</i> etiquetado
flbA-GSP1	CCC TCC CGC ATT GTA ACC ACT ACT	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
flbA-GSP2	TGA ACG TTG TGA GCG ACT CAT CG	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
flbA-GFP1	CGA TGA GTC GCT CAC AAC GTT CAG GAG CTG GTG CAG GCG CTG GAG CC	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
flbA-GSP3	TGA CAG TAA TTA TCT ACA CGC GTG	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
flbA-GSP4	GTC TTC ACC ACT GGT CAA ACC	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
flbA-GFP2	CAC GCG TGT AGA TAA TTA CTG TCA GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG	Obtención cepa <i>flbA</i> etiquetado
brlAp1Up	CCC CCG GGG TCT TCG AGC GAC GGG GC	Amplificación del promotor de <i>brlA</i> para EMSA
brlAp1Dw	CCC CCG GGG TCT TCG AGC GAC GGG GC	Amplificación del promotor de <i>brlA</i> para EMSA
brlAp2Up	GCT CTA GAC CAC AAT GGC TGA TAC CGG ACC	Amplificación del promotor de <i>brlA</i> para EMSA

brlAp2Dw GCT CTA GAC CAC AAT GGC TGA Amplificación del promotor de *brlA*
 TAC CGG ACC para EMSA

Tabla M&M2.: Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

2. Condiciones de cultivo

Durante este trabajo, las cepas de *A. nidulans* han sido crecidas y cultivadas siguiendo los protocolos estandarizados para este hongo (Pontecorvo *et al.*, 1953). De forma generalizada se ha utilizado el medio mínimo (MMA) o medio completo (MCA; MMA + 5g l⁻¹ extracto de levadura), en forma sólida, añadiendo 1% agar, o líquido con los suplementos apropiados en caso de los mutantes auxótrofos.

En la siguiente tabla se muestran los medios de cultivo y soluciones utilizadas para el cultivo de cepas de *Aspergillus nidulans*.

Medios y disoluciones	Preparación (por litro)
Disolución de elementos traza (1000x)	22g ZnSO ₄ · 7 H ₂ O; 11g H ₃ BO ₃ ; 5g MnCl ₂ · 4 H ₂ O; 3,14g FeSO ₄ · 2 H ₂ O; 1,6g CoCl ₂ · 6 H ₂ O; 1,6g CuSO ₄ · 5 H ₂ O; 1,1g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O; 50 g Na ₂ EDTA; ajustado a pH=6,8 con KOH; Esterilizada por autoclavado.
Disolución de sales (50x)	26g de KCl; 26g de MgSO ₄ ·7H ₂ O; 76g de KH ₂ PO ₄ ; 2,5ml de solución de elementos traza; Esterilizada por autoclavado.

Disolución de glucosa (10x)	200g glucosa; Esterilizada por autoclavado.
Disolución de sacarosa (10x)	300g sacarosa; Esterilizada por autoclavado.
Disolución de tartrato amónico (100x)	92g tartrato amónico; Esterilizada por autoclavado.
Disolución de MgSO ₄ (20x)	10,4g MgSO ₄ .7 H ₂ O; Esterilizada por autoclavado.
Medio mínimo con nitrato (MMA)	6,0g NaNO ₃ ; 1,5g KH ₂ PO ₄ 0,5g KCl; 15g agar (sólo en el caso de sólido); 1,0ml elementos traza; Ajustar a pH=6,8; Esterilizada por autoclavado; Añadir 100ml solución de glucosa; Añadir 50ml de solución de MgSO ₄ .
Medio completo sólido (MCA)	MMA + 5g extracto levadura
Medio mínimo con tartrato amónico (MMA-tartrato)	20ml de solución de sales; Ajustar a pH=6,8 con NaOH; 15g agar (sólo en el caso de sólido); Esterilizada por autoclavado; Añadir 100ml solución de glucosa; Añadir 10ml de solución de tartrato amónico.
Medio inductor de <i>alcA(p)</i> (MMT + 5Y)	20ml de solución de sales; 12g treonina (100mM) 5g extracto de levadura; Ajustar a pH=6,8 con NaOH; 15g agar (sólo en el caso de sólido); Esterilizada por autoclavado; Añadir 10ml de solución de tartrato amónico.

Medio de regeneración (MMR)	20ml de solución de sales; 342g sacarosa (1M); Ajustar a pH=6,8 con NaOH; 15g agar; Esterilizada por autoclavado; Añadir 100ml solución de glucosa; Añadir 10ml de solución de tartrato amónico.
Medio de regeneración-TOP (MMR-TOP)	20ml de solución de sales; 342g sacarosa (1M); Ajustar a pH=6,8 con NaOH; 6g agar; Esterilizada por autoclavado; Añadir 100ml solución de glucosa; Añadir 10ml de solución de tartrato amónico.
Medio de Fermentación (MFA)	20ml solución de sales; 25g Corn Steep Liquor (CSL) Ajustar a pH=6,8 con NaOH; Esterilizada por autoclavado; Añadir 100ml solución de sacarosa; Añadir 10ml de solución de tartrato amónico.

Tabla M&M3.: Medios de cultivo y disoluciones de partida utilizados.

Los experimentos de agotamiento de nutrientes en medio sólido se realizaron reduciendo las concentraciones de fuente de carbono o nitrógeno (Skromne *et al.*, 1995, Etxebeste *et al.*, 2008). En lugar de utilizar 2% de glucosa se usó 0,4% (p/v) como fuente principal de carbono, o 14mM sodio nitrato en lugar de 70mM como fuente de nitrógeno.

Los experimentos de estrés, en cambio, se llevaron a cabo añadiendo el compuesto hasta la concentración señalada para cada uno de ellos. En el caso de estrés osmótico, además de añadir KCl (0,6M), se añadió también MES (ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico, Sigma; 0,05M) como tampón del pH del medio (pH=6,8) y en el caso de estrés salino la concentración final de anión fosfato (NaH_2PO_4) fue 0,5M.

Cuando se utilizó medio líquido para analizar el efecto de estos estreses, las cepas fueron cultivadas a 37°C, a partir de un inóculo de 10⁶ esporas/ml, durante 18 horas en medio mínimo líquido y con una agitación de 250 rpm. Tras este periodo, los micelios de las cepas se recogieron por filtración, se lavaron con MMA y se transfirieron a medio MMA fresco complementado con el compuesto correspondiente. La morfología del micelio se evaluó tras 10 y 20 horas de cultivo utilizando un microscopio Nikon Optiphot, en modo de contraste de fases y tomando las imágenes con una cámara Nikon FX-35DX.

Los experimentos de complementación extracelular fueron realizados como se describió en Etxebeste *et al.* (2008), inoculando puntualmente sobre medio sólido en una placa de Petri las dos cepas a analizar a una distancia de 2 cm entre ellas. Tras 3, 4 y/o 5 días las zonas de contacto fueron observadas y fotografiadas con una lupa binocular Nikon SMZ800 equipada con una cámara Nikon Coolpix8400. Se utilizaron siempre cepas con diferente color de esporas para reconocer de forma rápida e inequívoca qué colonia estaba generando conidióforos en cada caso y se evitaban falsos positivos por posible formación de heterocariontes.

La inducción del desarrollo sexual y asexual se realizó siguiendo una variante de la descrita por (Law & Timberlake, 1980, Aguirre, 1993). Se cultivó el micelio durante 18 h en medio mínimo líquido, en las condiciones arriba descritas. Tras este periodo los micelios de las cepas a analizar se filtraron con membranas de nitrocelulosa (Milipore, d_p=0.45µm). Estas membranas se depositaron en placas de medio mínimo sólido, cultivando durante 6, 12, 24 y 48 horas previas a la recogida de muestras, las cuales se guardaron en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN total.

3. Transformación de *Aspergillus nidulans*

La transformación de *Aspergillus nidulans* se realizó siguiendo el protocolo establecido en Etxebeste *et al.*, 2008, siendo una variante del descrito en (Tilburn *et al.*, 1983). Para transformar, primeramente se obtienen protoplastos partiendo de un micelio vegetativo crecido en condiciones limitantes (baja temperatura y medio mínimo) y posteriormente se transformaron con fragmentos de ADN lineales o circulares utilizando PEG para fusionar dichos protoplastos.

En la siguiente tabla se muestran las soluciones y medios específicos utilizados durante la obtención de protoplastos, así como en la posterior transformación.

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

Tabla M&M4.: Soluciones empleadas en la obtención y transformación de protoplastos de *Aspergillus nidulans*.

Así, se inocularon 10⁶ esporas de la cepa a transformar en un matraz Erlenmeyer de 1000ml conteniendo 300ml de MMA líquido y suplementado con los nutrientes necesarios para las diferentes auxotrofías. El micelio se creció durante 12 ó 18 horas a 37 ó 30°C, respectivamente, y se recogió por filtración utilizando Miracloth

(Calbiochem) estéril. Una muestra de 1,0-2,0 g de micelio húmedo se trató para obtener protoplastos. Al micelio se añadieron 10 ml de Solución 2 (ver tabla M&M4) y 200mg/g de micelio de Glucanex® (Novozymes) y la mezcla se incubó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml a 30°C y 100 rpm hasta que se observó la aparición de abundantes protoplastos libres (~90min).

Una vez obtenidos los protoplastos se llevó a cabo la purificación y el lavado de los mismos. La mezcla de digestión se diluyó a la mitad añadiendo Solución 2 (ver tabla M&M4), dividiéndolo posteriormente en dos tubos. En cada tubo se añadieron lentamente 10 ml de Solución 5, evitando que las dos soluciones se entremezclaran, formando así dos fases claramente diferenciables. Los tubos fueron centrifugados durante 10 min, a 4000g y 4°C, tras lo cual la banda de protoplastos se formó en la interfase. Esta banda fue recogida y transferida a otro tubo, donde se le añadió Solución 6 en una relación de 2 volúmenes de Solución 6 por cada volumen de suspensión de protoplastos. Los protoplastos se recogieron centrifugando esta suspensión a 4°C durante 10min, a 2800g y, tras retirar el sobrenadante, fueron suavemente resuspendidos en 1ml de Solución 7, y transferidos a tubos de 1,5ml.

Los protoplastos purificados se transformaron de la siguiente manera, añadiendo en un tubo Falcon de 50 ml:

- 50µl de Solución 8 (tabla M&M4).
- Diferente volúmenes de ADN completando con Solución 7 hasta 50µl.
- El volumen de la suspensión de protoplastos equivalente a alrededor de $2 \cdot 10^6$ protoplastos.

Se mantuvieron los tubos en hielo durante 20min, tras lo cual se añadió 1ml de Solución 8 a cada uno y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 5min. Transcurrido este tiempo se añadieron 3ml de Solución 7 y alrededor de 45ml de medio MMR-TOP precalentado a 50°C. Se mezcló y se vertió sobre medio sólido MMR selectivo (sin el marcador de la auxotrofia a complementar en cada transformación) y una porción de esta mezcla sobre MMR no-selectivo (con suplementos para las diferentes auxotrofias de la cepa) a modo de control.

4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

Durante el trabajo realizado a lo largo de esta tesis se han utilizado las siguientes técnicas en lo que respecta a ADN y ARN:

4.1. Extracción de ADN genómico de A. nidulans

El ADN genómico se extrajo de micelios crecidos en medio líquido. Una suspensión con concentración final de 10^6 esporas/ml de la cepa correspondiente se inoculó en 30ml de medio mínimo líquido suplementado con los nutrientes adecuados y contenido en matraces Erlenmeyer de 100ml. Cada cepa se cultivó a 37°C y con agitación orbital a 250rpm, durante 15 horas. El micelio se recogió por filtración con Miracloth y fue liofilizado durante 15-18 horas. La extracción de ADN del micelio liofilizado se realizó utilizando el Kit GenElute™ Plant Genomic ADN Miniprep Kit (Sigma). Se confirmó la correcta extracción mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) al observar la banda correspondiente al ADN genómico de *A. nidulans* a la altura de 23Kb.

4.2. Extracción de ARN total de A. nidulans

Las muestras recogidas como se describe en el apartado Materiales y Métodos 2 fueron molidas en mortero con ayuda de nitrógeno líquido, evitando en todo momento que las muestras se descongelaran. El triturado de micelio obtenido se transfirió a tubos de 2ml, añadiendo a cada tubo 1ml de solución TriReagent (Fluka) y mezclando por vortex hasta mojar todo el micelio.

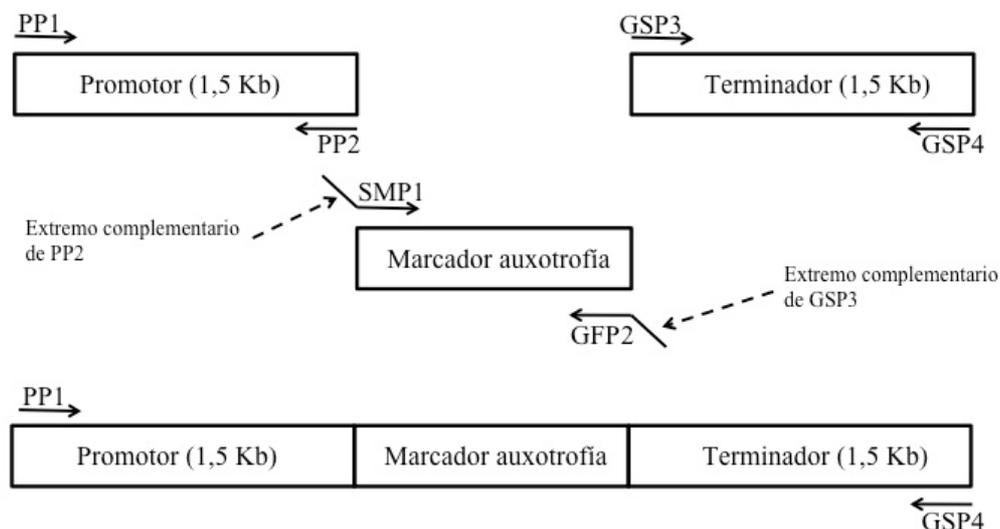
Tras incubar los tubos 5min a temperatura ambiente, invirtiéndolos periódicamente, se añadió 0,2 ml de cloroformo por tubo y se dejaron reposar 3min, de nuevo a temperatura ambiente. Una vez concluido este periodo, se centrifugaron a 12000g, durante 15min, a 4°C, se transfirió la fase acuosa (fase superior), a tubos nuevos de 2ml. Se repitió todo el proceso una segunda vez, esta vez utilizando 0,75ml de solución TriReagent. A esta segunda fase acuosa, se le añadió 0,5 ml de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, mezclando periódicamente por

inversión y centrifugando después a 12000g, durante 10min a 4°C, precipitando así el ARN.

Finalmente, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1ml de una solución de etanol/agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma) al 75% (v/v). Tras mezclar y disolver el ARN, se centrifugaron las muestras a 7500g, durante 5min, a 4°C. Se volvió a eliminar el sobrenadante con vacío y se disolvieron las muestras en 20-200µl de agua tratada con DEPC (libre de RNAsa), midiendo la cantidad de RNA total extraído en cada muestra mediante el sistema QuBit™ (Invitrogen).

4.3. Generación de mutante nulo, etiquetado o de sobreexpresión

Para estas tres técnicas se siguió con ligeras modificaciones que a continuación se detallan el protocolo descrito por Yang *et al.*, 2004. Así, los mutantes nulos se obtuvieron transformando la cepa correspondiente con un fragmento lineal de ADN que contenía las regiones flanqueantes 5' y 3' del ORF del gen cuyo nulo se quería realizar, y entre ambos fragmentos, fusionado por PCR, el marcador de auxotrofia (Fig M&M1).

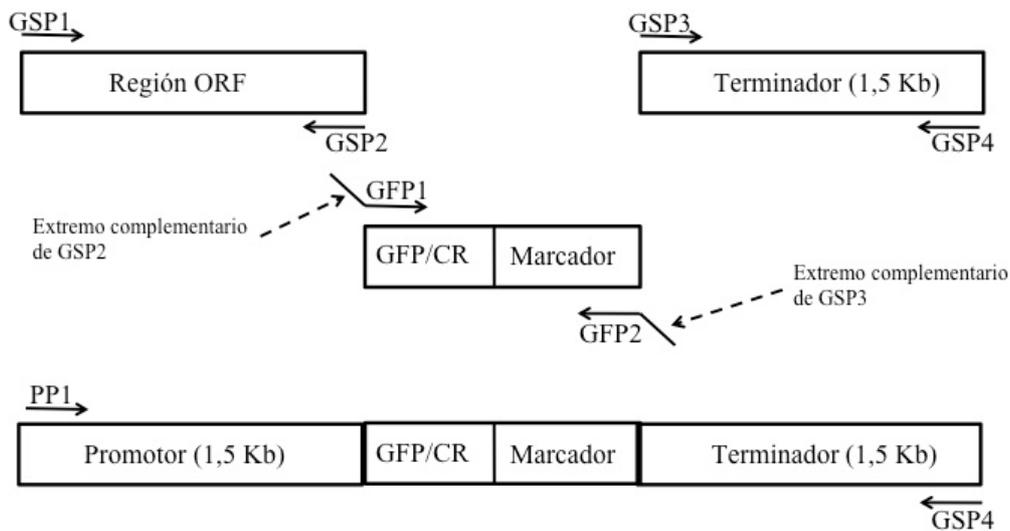


Oligonucleótidos:

- PP1: Promotor Primer 1
- PP2: Promotor Primer 2
- SMP1: Selectable Marker 1; complementario PP2 + específico del marcador 5'
- GFP2: Green Fluorescence Primer 2; complementario GSP3 + específico del marcador 3'
- GSP3: Gene Specific Primer
- GSP4: Gene Specific Primer 4

Fig M&M1: Esquema representativo del proceso de generación por PCR de mutantes nulos. Construcción conteniendo el promotor y terminador fusionados al marcador de auxotrofia. Amplificación de cada uno de los tres fragmentos a fusionar y PCR de fusión para la generación de la construcción.

Para los etiquetados, tanto con GFP, como con CherryRed, se siguió el mismo protocolo, con la única diferencia de que el fragmento de ADN con el que se transformaba contenía la región del ORF, la proteína fluorescente + marcador y por último la región flanqueante 3' (Fig M&M2).



Oligonucleótidos:

- GSP1: Gene Specific Primer 1
- GSP2: Gene Specific Primer 2
- GFP1: Green Fluorescence Primer 1; complementario GSP2 + específico del marcador 3'
- GFP2: Green Fluorescence Primer 2; complementario GSP3 + específico del marcador 3'
- GSP3: Gene Specific Primer 3
- GSP4: Gene Specific Primer 4

Fig M&M2: Esquema representativo del proceso de generación por PCR de proteínas etiquetadas. Construcción conteniendo la región ORF y terminador fusionados al epítipo + marcador de auxotrofia. Amplificación de cada uno de los tres fragmentos a fusionar y PCR de fusión para la generación de la construcción.

El caso del etiquetado con la proteína fluorescente bimolecular se efectuó de manera diferente. Así, las proteínas a analizar fueron etiquetadas con mitades separadas de la proteína amarilla fluorescente (YFP), insertadas en los plásmidos pYH01 y pYH02 (Takeshita *et al.*, 2008). Tras amplificar los genes correspondientes a

las proteínas a analizar empezando por el ATG inicial, se insertaron en esos dos plásmidos, quedando en fase la expresión de YFP y el gen candidato. Como estos dos plásmidos tienen el mismo gen marcador de auxotrofia (*pyrG*), los derivados de pYH02 fueron nuevamente amplificados por PCR e insertados en pBS-pyro, obteniendo así dos plásmidos, cada uno con una mitad de YFP y un gen de marcador de auxotrofia diferente y fueron utilizadas para transformar.

Las cepas de sobreexpresión también se construyeron a partir de un plásmido, en este caso pALC-pyroA*. Este plásmido se obtuvo desde el plásmido pGPD, que contenía las regiones promotora y terminadora de *gpdA*, así como una forma truncada de *pyroA* (plásmido facilitado por el Dr. M.A. Peñalva, sin publicar). El promotor original fue eliminado mediante digestión Asp718 y EcoRI, y el promotor *alcA* amplificado por PCR fue insertado en los mismos sitios de restricción. Una vez obtenido el plásmido, el gen que interesaba sobreexpresar se insertaba en el plásmido y se transformaba *A. nidulans*.

4.4. Southern blot

Los experimentos de Southern blot tuvieron como principal objetivo comprobar la correcta inserción de las diferentes moléculas de ADN con las que se transformaron las cepas de *A. nidulans*.

El ADN genómico (apartado M&M4.1) de las cepas de *A. nidulans* transformadas y de la cepa parental fue digerido con la enzima de restricción adecuada. Tras la digestión y correspondiente gel de agarosa, se realizó la desnaturalización del ADN, durante 45min, y con agitación suave (solución base: 87,66g/l de NaCl y 20g/l de NaOH); y la neutralización, realizando dos baños de 30min (solución base: 60,60g/l de Trizma Base y 175,30g/l de NaCl, ajustado a pH=7,5 con HCl). Este tratamiento tiene como objetivo la desnaturalización de las hebras de ADN para que posteriormente la sonda pueda generar híbridos. Una vez desnaturalizado el ADN se efectuó la transferencia a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) mediante capilaridad y utilizando como solución de transferencia SSC20x (175,30g/l NaCl y 88,22g/l citrato sódico, ajustado a pH=7,0 con HCl). Tras la transferencia se fijó el

ADN a la membrana utilizando luz ultravioleta (Vilber Lourmat, BLX-E254, 254nm y 120mJ).

Las sondas de ADN fueron marcadas y preparadas con digoxigenina-dUTP por amplificación mediante PCR del fragmento de ADN adecuado (DIG Labelled Kit, Roche), seleccionado para que en combinación con el enzima de restricción que se fuera a utilizar consiguiésemos ver claramente si la inserción ocurría correctamente.

La hibridación de la sonda no radioactiva se realizó a 42°C utilizando la solución de hibridación de Church (1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaPO₄, pH = 7.2 and 7% SDS; (Church & Gilbert, 1984)), con la que se realizó una pre-hibridación durante 2 horas y la posterior hibridación durante 15horas, esta última habiendo añadido la correspondiente sonda desnaturalizada previamente a 95°C.

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación se llevó a cabo el revelado de la membrana. Se efectuaron lavados para eliminar cualquier resto de hibridación inespecífica, 2x5 min a temperatura ambiente en SSC2x y SDS 0,1% y 2x15 min a 65°C en SSC 0,5x y SDS 0,1%. Posteriormente se realizó el protocolo recomendado por la casa comercial (Roche), con el objetivo de producir la reacción quimioluminiscente:

- 30 min de solución bloqueante (Roche, stock 10x, diluido en una solución conteniendo ácido maléico (0.1M), NaCl (0.15M) y ajustada a pH=7.5 con NaOH).
- 30 min en solución bloqueante
- 30 min en solución bloqueante + anticuerpo anti-digoxigenina (75mU/ml)
- 2x15 min en una solución de lavado que contiene ácido maléico (0.1M), NaCl (0.15M) y tween 20 (0,3%, Acros Organics), ajustada a pH=7.5 con NaOH
- 5 min en solución de detección, conteniendo Trizma base (0.1M, Sigma) y NaCl (0.1M), ajustado a pH=9.5 con HCl.
- 5 min en el reactivo CDP-Star que produce luminiscencia + 10 min a 37°C

Tras realizar todo el proceso de luminiscencia, la membrana fue expuesta a películas fotográficas para obtener los resultados.

4.5. Northern blot

Esta técnica fue utilizada para los análisis de expresión génica, utilizando los ARN totales extraídos según el apartado Materiales y Métodos 4.2.

Un total de 10µg de una solución de ARN total por cada muestra/condición a analizar fueron cargados y las diferentes especies separadas en un gel de agarosa/formaldehido desnaturalizante. Para preparar un gel de 100ml se fundió 1,2g de agarosa en 72ml de agua tratada con DEPC, se añadió a continuación 10ml de MOPS 10x (0,4M MOPS, Sigma; 0,1M acetato sódico; 0,01M EDTA), y finalmente cuando la temperatura de la solución había bajado a 42-48°C se añadieron 18ml de formaldehido. El gel se dejó solidificar en su correspondiente bandeja de electroforesis en la campana extractora de humos. Las muestras, por su parte, se prepararon añadiendo 12,5µl de formamida, 4µl de formaldehido (33%), 2,5µl de MOPS 10x y el volumen adecuado, en un total de 10µl con agua tratada con DEPC, de cada muestra de ARN. Tras tratar las muestras preparadas 15min a 65°C, se añadió solución de carga, se cargaron las muestras y se corrió el gel a 30-40V en solución MOPS 1x, durante 15-16 horas.

La transferencia se realizó de la misma manera que en el caso del Southern blot (apartado M&M4.4). Como paso previo a la transferencia por capilaridad el gel fue lavado con agua para eliminar el formaldehido remanente y el exceso de bromuro de etidio con el que se visualiza la calidad y se controla la carga de cada muestra de ARN. La fijación del ARN a la membrana y la hibridación con la sonda correspondiente también se desarrollaron de la misma manera que en el apartado anterior salvo que en este proceso la sonda fue marcada radioactivamente. Así, se utilizaron fragmentos correspondientes al ADN complementario del gen a analizar, que tras desnaturalizarlos se marcaron con dCTP α ³²P (30-50µCi), utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche) y se purificaron con columnas con Sephadex-G50 como fase estacionaria (Amersham).

Al utilizar radioactividad, el proceso de detección varió con respecto al Southern blot. En este caso, tras los lavados que se realizaron tras la hibridación (2x5 min a temperatura ambiente en SSC2x y SDS 0,1% y 2x15 min a 65°C en SSC 0,5x y SDS 0,1%), se comprobó la membrana con el contador Geiger. En caso necesario se realizaron nuevos baños hasta una limpieza adecuada, tras la cual se expuso película

sensible a la radioactividad a -80°C o se empleó detección mediante pantallas de PhosphorImager (Fuji).

5. Técnicas de biología molecular en *E. coli*

5.1. Medios para E. coli

El medio que se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de cepas de *E. coli* fue LB. Este medio contiene: Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y en el caso de medio sólido se le añadió agar 1,5 % (p/v). El medio se esterilizó por autoclave.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, se añadió este antibiótico (en forma de sal sódica) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ tanto en medio sólido como líquido, y cuando la selección fue para transformantes resistentes a Kanamicina la concentración final del antibiótico fue de 50 $\mu\text{g/ml}$. Además, y en caso de realizarse la selección de recombinantes por ausencia de actividad β -galactosidasa, se añadió al medio X-gal a una concentración final de 83 mM e IPTG a 0,1mM.

5.2. Transformación de E. coli

Se utilizó la técnica del shock térmico para la transformación células competentes de las cepas *DH1* y *DH5 α* de *E. coli*. En un tubo se mezclaron 100 μl de células competentes con la cantidad adecuada de ADN.

La mezcla se mantuvo en hielo durante 20min, se incubó a 42°C durante 1 min y se volvió a dejar en hielo durante 1min. Tras añadir 1ml de medio LB, se incubó la mezcla a 37°C y 250rpm, durante 1h. Volúmenes variables de la mezcla de transformación fueron inoculados sobre medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado.

5.3. Extracción de ADN plasmídico

La colonia bacteriana con ADN plasmídico a extraer fue inoculada en 10ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correcto. Se cultivó la mezcla a 37°C y 250rpm, durante 15 horas, para posteriormente extraer el ADN plasmídico mediante el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La correcta extracción fue verificada mediante electroforesis de agarosa (0,8% p/v) en TAE 1x.

5.4. Expresión de proteínas recombinantes de *E. coli*

La expresión se llevó a cabo en la cepa DH1 de *E. coli* transformada con el plásmido de expresión adecuado (normalmente pGEX-2T). Se cultivó la bacteria en 10 ml de medio LB con antibiótico a 37°C durante 16 horas. Se diluyó 1 ml del cultivo en un volumen final de 50 ml de LB + antibiótico y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 0,5-0,8$. En ese momento se añadió IPTG hasta una concentración de 0,1 mM y se incubó durante diferentes tiempo y temperatura, dependiendo de la proteína que se quería expresar. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 20 ml de PBS (150 mM NaCl, 200 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaH_2PO_4) al que se había añadido el cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Las células fueron lisadas utilizando una French Press, realizando 3 pasos a 1200 mbar, y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante.

6. Aislamiento y manipulación de proteínas de *A. nidulans*

6.1. Extracción de proteínas totales

Para la extracción proteínas totales de cepas de *A. nidulans* se inocularon 10^6 esporas/ml en un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de fermentación (MFA; ver tabla M&M3; (Orejas *et al.*, 1995)). Tras cultivarlo durante 15-18 horas a 37°C, se recogieron 0,25 g de micelio filtrado y escurrido, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó en un liofilizador Cryodos (Telstar). Se añadió una bola de

cerámica de 5mm de radio y se rompió el micelio con un pulso de 15 segundos a fuerza 4,0 en el FP120 FastPrep Cell Disruptor de BIO101/Savant.

A continuación, se añadió 1 ml de tampón NP40 (HEPES 5 mM pH 7,5; KCl 20 mM; 0,1% NP40; 1mM Na₃EDTA; 0,5 mM Ditioneitol (DTT); cocktail de inhibidores de proteasas Complete de Roche) y se resuspendió el polvo de micelio mediante agitación en rueda giratoria a 4°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó 30 minutos a 14000 rpm y 4°C, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para los ensayos de “Western-blot” se precipitaron 50 µg de proteína con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final 10% (v/v), y se lavaron con dos mezclas Etanol/Eter 1/1 y 1/3 sucesivamente, centrifugando tras cada lavado/resuspensión a 14000 rpm, 5 min y 4°C.

6.2. *Western blot*

La separación monodimensional del extracto proteico se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS, SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras precipitadas según el apartado anterior fueron resuspendidas en tampón de carga de Laemli (Cracking-buffer) y se desnaturalizaron hirviendo a 95°C durante 5min. Los geles se tiñeron con la solución Biosafe Coomassie Staining (BioRad) para visualizar las bandas correspondientes a cada proteína o grupo de estas con la misma movilidad electroforética.

Tras la separación electroforética del extracto proteico se transfirieron estas proteínas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente fueron expuestas a los correspondientes anticuerpos que reconocen epítomos endógenos o etiquetas añadidas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron, para GFP un monoclonal de ratón anti-GFP de Roche (1:10000), un anti-actina fúngico generado en ratón de ICN Biomedical (1:5000) o el monoclonal de rata anti-HA de Roche (1:3000). Como anticuerpos secundarios, conjugados a la peroxidasa de rábano, se utilizaron sueros de cabra contra inmunoglobulinas IgG de ratón (1:3000) o de rata (1:5000), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad peroxidada se detectó utilizando quimioluminiscencia ECL (Amersham) y la imagen se capturó con el dispositivo Fuji LAS3000.

6.3. Ensayos de Pull-Down

Los experimentos de interacción proteína-proteína (*pull-down*) se realizaron utilizando proteínas de fusión GST expresadas en *E. coli* y extractos proteicos totales de *A. nidulans*. La proteína de fusión fue unida a la resina glutation-sefarosa (Amersham), previamente lavada con PBS (150 mM NaCl, 200 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄) al que se había añadido el cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Se incubó la fracción soluble del extracto de *E. coli* con esta resina durante 1h a 4°C. La resina con la proteína unida se volvió a lavar con PBS + inhibidores de proteasas para retirar las proteínas de *E. coli* que pudieran quedarse atrapadas en la resina inespecíficamente y se incubó de nuevo durante 2h con 2 mg del extracto proteico de la cepa *A. nidulans* que expresa la proteína de interés etiquetada. Una vez transcurrido ese tiempo, la resina que contenía los posibles complejos de interacción fue lavada, para finalmente resuspender la resina tampón de carga de Laemli (Cracking-buffer). Se corrió un gel en condiciones desnaturizantes (ver apartado M&M6.2) y mediante Western-blot (M&M6.2) se determinó la presencia de la proteína de interés interaccionando con la proteína de fusión.

7. Ensayos de unión ADN-proteína

7.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

- *Obtención de oligonucleótidos de doble hebra y marcaje de sondas*

Los oligonucleótidos de doble hebra fueron preparados siguiendo el protocolo descrito por Orejas *et al.* (1995), anillando cantidades equimolares de los oligonucleótidos de hebra simple en una solución que contiene 50mM Tris-HCl (pH=7,5), 10mM MgCl₂, 5mM DTT y 1mM de espermidina. El ADN fue desnaturizado y el anillamiento de las hebras se logró enfriando lentamente las mezclas hasta los 40°C, manteniéndolas luego a 4°C durante 16 horas. Los fragmentos de doble cadena se purificaron utilizando geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 15% y siguiendo el método “Crush and Soak” de (Maxam & Gilbert, 1980). Las concentraciones de los fragmentos de ADN se estimaron midiendo la densidad óptica de las soluciones a 260nm.

El marcaje radioactivo de sondas se realizó mediante relleno de extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, en presencia de una mezcla de dNTPs conteniendo [α - 32 P]dCTP radioactivo.

En cuanto a los fragmentos de promotores específicos que se pretendían analizar, se amplificaron mediante PCR, se introdujeron en el plásmido pGEM-T-Easy y se extrajeron utilizando enzimas de restricción que dejaban extremos 5' protuberantes y un nucleótido citosina como primera o segunda base, antes de marcarlos radiactivamente.

De esta manera se estudiaron tres fragmentos de promotor de *flbD*, denominados AB, CD y EF. Se utilizaron cebadores específicos para amplificar cada fragmento: flbD(p)1 sense y flbD(p)1 antis; flbD(p)2 sense y flbD(p)2 antis; flbD(p)3 sense y flbD(p)3 antis, respectivamente (tabla M&M2).

En el caso del promotor de *brlA*, este se dividió en dos fragmentos solapantes que fueron amplificados con las parejas de oligonucleótidos brlAp1Up/brlAp1Dw y brlAp2Up/brlAp2Dw (tabla M&M2). Estos fragmentos se extienden 3,5kb desde el ATG inicial de *brlA α* . Los fragmentos fueron introducidos en el plásmido pGEM-T-easy (Promega), y digeridos posteriormente con los enzimas *BamHI*, *AvaI* y *EcoRI*. Estas digestiones generaron una colección de fragmentos que fueron posteriormente marcados radiactivamente y ensayados en EMSAs.

- *Ensayos de retardo en gel*

Este tipo de ensayo permite analizar la capacidad de interacción una proteína, o en su defecto un dominio, del tipo factor de transcripción con una sonda de ADN que contiene sitios de unión específicos de ese factor en concreto, mediante la observación del cambio de movilidad del ADN en un gel no desnaturizante de poli(acrilamida). La reacción de interacción se llevó a cabo en el Tampón Retardo (HEPES-KOH 25mM pH 7,9, KCL 50 mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, DTT 1 mM y glicerol al 20%) mezclando las diluciones adecuadas de las muestras proteicas a cargar, el competidor correspondiente, ya fuera inespecífico como puede ser poli(dIdC) o poli(dAdT) (Amersham) o específico, y la sonda radioactiva. El cambio de movilidad electroforética de la sonda en gel se realizó utilizando poli(acrilamida) al 4% (acrilamida:bisacrilamida 40:1) en 0,5 x TBE. La electroforesis se realiza en frío a 4°C

corriendo previamente durante 30 min a 200 Voltios y posteriormente, una vez cargadas las muestras durante aproximadamente 2 horas y 30 min en las mismas condiciones. Finalizada la electroforesis, el gel se seca a 80°C durante 1 hora y se expone frente a una película sensible a la radiactividad.

7.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina permiten analizar la capacidad de unión entre una proteína y un fragmento de ADN de promotor *in vivo* (Orlando *et al.*, 1997, Bernreiter *et al.*, 2007). Micelios de cepas con el factor de transcripción de interés etiquetado se cultivaron en medio líquido durante un tiempo determinado. Se procedió a la fijación de las células añadiendo formaldehído a una concentración final de 1%, proceso que se finalizó con la adición de glicina (125 mM). Los cultivos fijados se sonicaron en un buffer de sonicación (50 mM HEPES KOH (pH 7.5); 140 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 7.5); 1% Triton X-100; 0.1% sodio deoxicolato), obteniendo fragmentos de ADN genómico entre 200-600 pb. El sobrenadante obtenido tras centrifugar se pre-incubó en presencia de Proteína G Agarosa (Roche), para evitar uniones inespecíficas. Se eliminó el precipitado antes de dividir la muestra en dos, incubando una mitad se en presencia de anticuerpo específico del epítipo (Anti-GFP; Roche), mientras la otra mitad fue utilizada como control simulado (sin anticuerpo). Tras 12 horas a 4°C de añadió a las dos muestras la Proteína G agarosa, la cual, uniéndose al anticuerpo, precipitaría el complejo proteína-ADN. Tras lavar el precipitado se procedió a la elución de los complejos proteína-ADN mediante la adición del tampón de elución (1% SDS/0.1 M NaHCO₃). Para finalizar se revertió la fijación, se purificó el ADN por columna Macherey-Nagel y se procedió a realizar las amplificaciones por PCR con cebadores específicos del promotor de interés. Los resultados obtenidos en muestras incubadas con anticuerpo específico fueron comparadas con los provenientes del control simulado, evaluando el enriquecimiento.

8. Microscopia

8.1. Condiciones de cultivo para experimentos de microscopía

La localización intracelular de las proteínas etiquetadas se analizó *in vivo*, cultivando la cepa a analizar en medio de cultivo líquido WMM (Watch Minimal Medium; MMA sin fosfatos (Peñalva, 2005)). Se comenzó a observar la localización de la fluorescencia desde la germinación de esporas, manteniendo el cultivo a 37°C durante todo el experimento.

En el caso del análisis de localización en estructuras específicas del conidióforo se tuvo que modificar la condición de cultivo ante la imposibilidad de generar conidióforos normales en un medio líquido. Por ello se generaron placas de microscopio con medio mínimo sólido, al que una vez solidificado, se le retiró la parte central. Se inocularon esporas de la cepa a analizar en la conjunción entre la base de la placa y el medio sólido, y tras incubar durante 16-24 horas a 37°C y añadir líquido, se observaron al microscopio.

En cuanto a determinar si dependencia del transporte de las proteínas correspondía al citoesqueleto de actina o de microtúbulos, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con Latrunculina B (Calbiochem; 100µM) o Benomilo (Aldrich; 3 µg/ml), respectivamente. Transcurridos 5min se comenzó a tomar fotografías. Tras ello, se retiró el medio para añadir nuevamente medio fresco y poder analizar la recuperación de la localización de la proteína. De la misma manera, también se analizó el envenenamiento de los circuitos energéticos de la célula, añadiendo al medio una mezcla de acida sódica (NaCN) y fluoruro sódico (NaF), a una concentración final de 15mM para cada producto.

8.2. Microscopio y obtención de imágenes

Las imágenes de los cultivos *in vivo*, a 37°C, se tomaron utilizando un microscopio Leica DMI 6000B, equipado con un objetivo 63x Plan Apo 1,4 N.A., iluminado con lámpara de mercurio de 100W y filtros GFP (excitación 470nm; emisión 525nm), Txred (excitación 562nm; emisión 624nm), y BGR (excitación 562nm; emisión 624nm), para coloración fluorescente GFP, CherryRed o YFP, respectivamente.

Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics), y procesadas utilizando los programas Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Universal Image).

**LOS REGULADORES
TEMPRANOS DE LA
CONDICIÓN, SU
DISTRIBUCIÓN
ESPACIAL Y POSIBLES
INTERACCIONES**

1. Introducción

Con el objetivo de identificar nuevos genes implicados en la regulación temprana de la conidiación y, a su vez, en la producción de señales extracelulares necesarias para el correcto desarrollo asexual, se llevó a cabo un programa de mutagénesis. Los mutantes seleccionados debían mostrar deficiencias en su capacidad de generar estructuras de reproducción asexual y, a su vez, ser capaces de transferir o recibir señales que suprimiesen sus fenotipos aconidiales en las zonas de contacto entre colonias.

En este proceso de selección se identificaron dos mutantes aconidiales denominados BD12 y BD13. Estos mutantes eran capaces de complementar extracelularmente a mutantes *fluG* y a su vez recibir señales que suprimiesen sus fenotipos de una cepa silvestre. Mediante técnicas de genética clásica se determinó que las mutaciones eran monogénicas y no ligadas, es decir localizadas en dos *loci* diferentes, como también demostró el análisis molecular que se describe a continuación. Un aspecto interesante que presentaban ambos mutantes aislados fue que sus respectivos fenotipos eran indistinguibles. Los genes en los que se localizaban las mutaciones responsables de los fenotipos pudieron ser identificados mediante complementación del fenotipo aconidal utilizando una genoteca de ADN genómico de *A. nidulans* insertada en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA1-Not1 ((Osherov *et al.*, 2000); ver Etxebeste *et al.*, 2008 para una detallada descripción de este proceso selectivo).

Uno de los *loci* identificados fue AN7542.3, anteriormente descrito como *flbB* (Yu *et al.*, 2006), y que fue caracterizado en profundidad por el Dr. Oier Etxebeste en su tesis doctoral (Etxebeste, 2008). *flbB* se localiza en el contig 129 del cromosoma IV y codifica a un factor de transcripción con un dominio de unión a ADN del tipo bZip. FlbB presenta una localización celular atípica para un factor de transcripción en este hongo filamentoso, acumulándose en el ápice de la hifa y en el núcleo más apical (Fig R1.1; (Etxebeste *et al.*, 2008, Etxebeste *et al.*, 2009a).

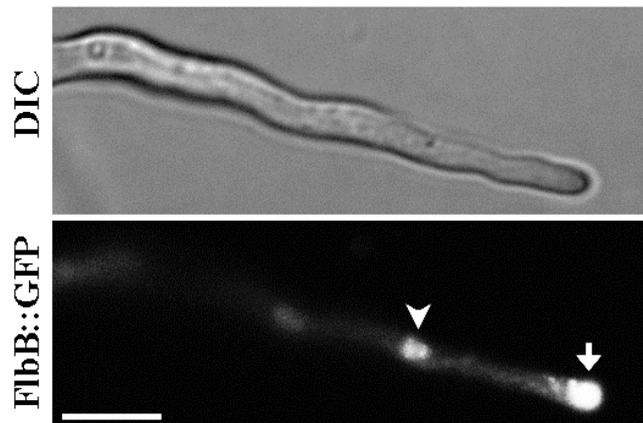


Fig R1.1. Localización subcelular de FlbB. Las flecha indica la localización de FlbB en el ápice y la punta de flecha en el núcleo más apical. Barra de escala = 10 μ m.

El segundo de estos genes fue identificado como *AN0721.3* o *flbE*, que se localiza en el contig 11 del cromosoma VIII. El producto de este gen también fue anteriormente relacionado con la inducción de la conidiación, si bien no había sido caracterizado en profundidad (Yu *et al.*, 2006). FlbE es una proteína de bajo peso molecular que presenta una distribución filogenética restringida a un determinado número de hongos con capacidad de conidiar. FlbE muestra determinadas regiones conservadas con sus posibles homólogos, lo que sugiere que son potenciales regiones funcionales, como se verá más adelante en esta tesis.

FlbB y FlbE forman también parte del grupo constituido por FlbA, FlbC y FlbD, y todos ellos son conocidos como los reguladores tempranos de la conidiación o *UDAs* (Wieser *et al.*, 1994). Todos estos reguladores participan en la inhibición del crecimiento vegetativo, la síntesis de un mismo metabolito inductor de la conidiación, la regulación del desarrollo del conidióforo y la activación de la ruta central del desarrollo, controlada por el gen *brlA* (Ni *et al.*, 2010).

La presencia del factor transcripcional FlbB en el ápice de las hifas permitió sugerir la hipótesis de la existencia de un mecanismo sensorial que determinase el comienzo del desarrollo de las células. El factor transcripcional FlbB ejercería la función de receptor de una señal involucrada en la inducción de la conidiación en la punta de la hifa. Así, tras detectarse esta señal o las condiciones adecuadas para el

desarrollo, FlbB migraría al núcleo donde supuestamente ejercería su función reguladora de la transcripción (Etxebeste *et al.*, 2009a).

Teniendo en cuenta que los *UDAs* comparten similitudes, tanto fenotípicas como mecánicas (todos ellos son necesarios para la producción de un mismo metabolito y la activación de *brlA*; ver Introducción general), se propuso una hipótesis sobre la participación de estas proteínas formando un posible complejo señalizador que se localizaría en la punta de la hifa. Para su verificación se examinó la localización celular del resto de reguladores tempranos de la conidiación conocidos.

Con el objeto de enmarcar los nuevos elementos de este estudio dentro del cuerpo de conocimiento ya descrito, este capítulo combina los resultados y la discusión en una misma sección.

2. Resultados y Discusión

2.1. Factores de regulación temprana sin distribución específica en la célula

De todos los componentes de la ruta temprana, FlbA es el que posee las características generales que lo clasificarían dentro de una ruta de transducción de señal (ver Introducción general). El papel de FlbA como regulador de proteínas G permite predecir su asociación con la membrana plasmática. Para determinar si FlbA, y por lo tanto el complejo heterotrimérico FadA/SfaD/GpgA que ha de regular, forman un complejo señalizador en el ápice de la hifa, se procedió a estudiar la localización celular de FlbA. Para ello se generaron cepas que expresaban formas etiquetadas fluorescentes de FlbA. La cepa BD244 expresaba FlbA::GFP y la cepa BD247 FlbA::CR. Ambas se generaron como se describe en la sección de Materiales y Métodos 4.3 y mostraron un fenotipo silvestre en cuanto a su capacidad de conidiación, lo que indicó que las quimeras eran funcionales (Fig R1.2A)

El estudio microscópico en cultivos líquidos de ambas cepas desveló que FlbA no presentaba ninguna localización específica en la célula. La fluorescencia era

detectable a lo largo de toda la hifa, tanto en los diferentes estadios de crecimiento vegetativo como tras la inducción del proceso de diferenciación del conidióforo (Fig R1.2B). No se observó exclusión o acumulación en una localización específica. El seguimiento de FlbA durante el desarrollo del conidióforo indicó que es abundante durante todo el proceso de morfogénesis y en todos los estadios (Fig R1.2B), lo cual concuerda con lo observado en experimentos de Western blot (no mostrado).

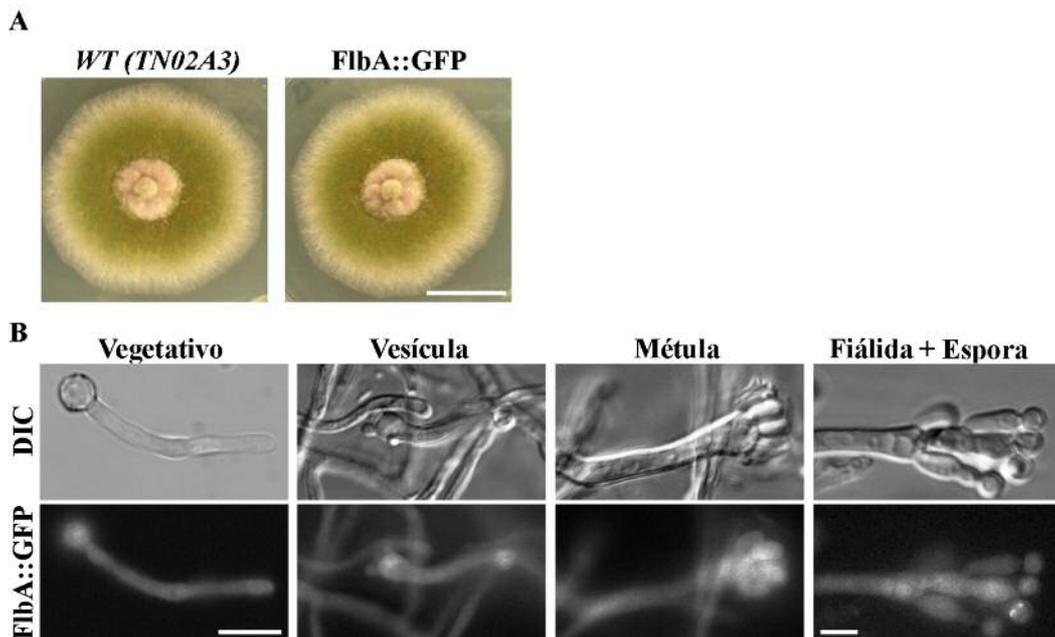


Fig R1.2. A) Morfología de colonias de las cepas silvestre (WT; TN02A3) y FlbA::GFP (BD244), cultivadas durante 72 horas en medios sólidos MMA. B) Localización intracelular de FlbA. Esta fue examinada observando FlbA::GFP en células vegetativas (cultivo líquido), vesículas, métulas, fiálidas y esporas (durante la esporulación asexual). Barra de escala = 10 μ m.

En *S. cerevisiae* la subunidad $G\alpha$ Gpa1 se localiza en membrana e interacciona directamente con la proteína reguladora con dominio RGS Sst2 (Dohlman *et al.*, 1996). Este hecho permitió proponer la supuesta formación de complejo proteína G-regulador y que éste estuviera asociado a membrana plasmática en *A. nidulans* (Yu, 2006). Sin embargo, la localización de FlbA observada aparentemente no se corresponde con esta hipótesis, aunque no podemos descartar que una fracción o población de FlbA sea la que realmente permanezca próxima o asociada a la membrana plasmática. Nuestros trabajos tampoco aportaron datos sobre una posible acumulación

en el ápice de la célula, descartando un heterocomplejo muy estable formado por FlbB con FlbA, aunque no se observa exclusión de la región apical.

La expresión durante todo el ciclo de vida de *A. nidulans* y la presencia de la proteína una vez inducido el desarrollo del conidióforo sugieren que FlbA podría actuar a diferentes niveles o tener un papel adicional en la célula. De hecho la función de FlbA también fue relacionada en trabajos previos con el proceso de autólisis (Adams *et al.*, 1998). El mutante nulo *flbA* muestra un fenotipo autolítico en las zonas centrales de la colonia y que podría estar inducido por estrés debido al agotamiento de nutrientes. Tras la inducción de la conidiación se activa un proceso de la autólisis que coincide espacial y temporalmente con el desarrollo (Emri *et al.*, 2008), proporcionando así nutrientes desde células autolisadas a las células que se están diferenciando. Sin embargo, trabajos más recientes plantean que la ruta de autólisis podría ser independiente de FlbA (Pócsi *et al.*, 2009). Por ello se sugirió que al no formarse conidióforos en ausencia de FlbA se visualizaría el proceso de autólisis de forma más patente. De este modo, la presencia de FlbA durante todo el ciclo del desarrollo del conidióforo la relacionamos con la necesidad de mantener inhibida la disociación del complejo heterotrimérico, de tal forma que el proceso de diferenciación no pueda ser revertido. Sin embargo, al no ser éste el tema principal de esta tesis, lo sugerimos únicamente como hipótesis y cuya verificación necesitaría un mayor análisis y un estudio más en profundidad que el realizado en esta tesis doctoral.

2.2. Factores de regulación temprana exclusivamente nucleares

Entre los factores conocidos como UDAs pueden reconocerse, según sus estructuras primarias, 3 supuestos factores de transcripción: FlbB, FlbC y FlbD (Yu *et al.*, 2006).

FlbC es un factor con un dominio de unión al ADN del tipo dedos de zinc clásicos C_2H_2 . Se procedió al etiquetado de esta proteína y se obtuvieron las cepas que expresaban FlbC::GFP y FlbC::CR (BD245 y BD249, respectivamente). De forma similar a lo observado con FlbA, la presencia en la célula de cualquiera de estas formas etiquetadas de FlbC no afectada a la capacidad de esporulación de la cepa, indicando

que las quimeras debían ser funcionales (no mostrado). En estudios microscópicos FlbC presentó una localización preferentemente nuclear en hifas vegetativas procedentes de cultivos líquidos. La fluorescencia era visible en todos los núcleos del sincitio y tanto en germínulas como en hifas maduras (Fig R1.3). Durante la fase del desarrollo asexual, FlbC siguió siendo detectable en todos los núcleos en cada etapa de la formación del conidióforo, desde la célula pie hasta las fiálidas. Sin embargo no se observó fluorescencia en el núcleo de la conidiospora (Fig R1.3). La presencia de FlbC en estadios posteriores a la inducción indicó que no solamente podría participar en la inducción y/o en etapas iniciales del desarrollo como se preveía, sino que podría ejercer alguna función en etapas posteriores. No obstante se precisan realizar estudios más detallados que aporten más información sobre esta faceta reguladora de FlbC.

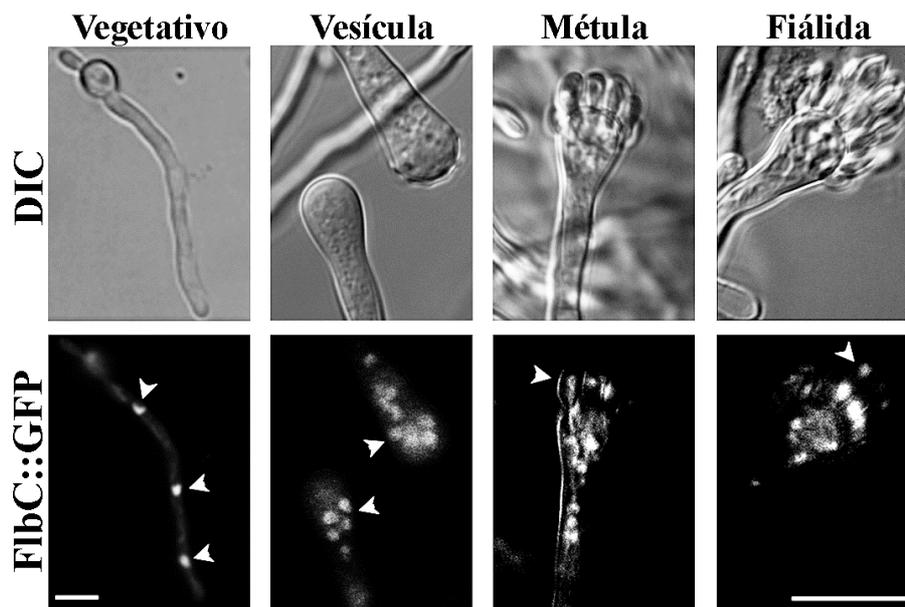


Fig R1.3. Localización intracelular de FlbC. Esta fue examinada observando FlbC::GFP en células vegetativas (cultivo líquido), vesículas, métulas y fiálidas (durante la esporulación asexual), siendo detectada en los núcleos (puntas de flecha). Barra de escala = 10 μ m.

FlbD es un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN del tipo cMyb. El etiquetado en el extremo C-terminal de FlbD con una proteína fluorescente siguió el proceso descrito en la sección de Materiales y Métodos 4.3 y siendo la misma estrategia que para los factores previamente descritos. Así se generaron las cepas BD246 y BD250, que expresan respectivamente FlbD::GFP y FlbD::CR. En

este caso las proteínas fusionadas también eran funcionales ya que las cepas etiquetadas mostraron capacidad similar a la de la cepa silvestre para conidiar. Al igual que en el caso anterior, el factor FlbD fue visualizado en todos los núcleos del sincitio, desde que ocurre la germinación de las conidias y durante el crecimiento vegetativo del micelio (Fig R1.4). Por el contrario, durante el desarrollo del conidióforo no se detectó fluorescencia en ningún tipo de célula especializada, como por ejemplo las vesículas (Fig R1.4), en las cuales se acumulan un número elevado de núcleos (Etxebeste *et al.*, 2009b) como se observa en una cepa que expresa la histona H1 etiquetada con GFP (H1::GFP; Fig R1.3B).

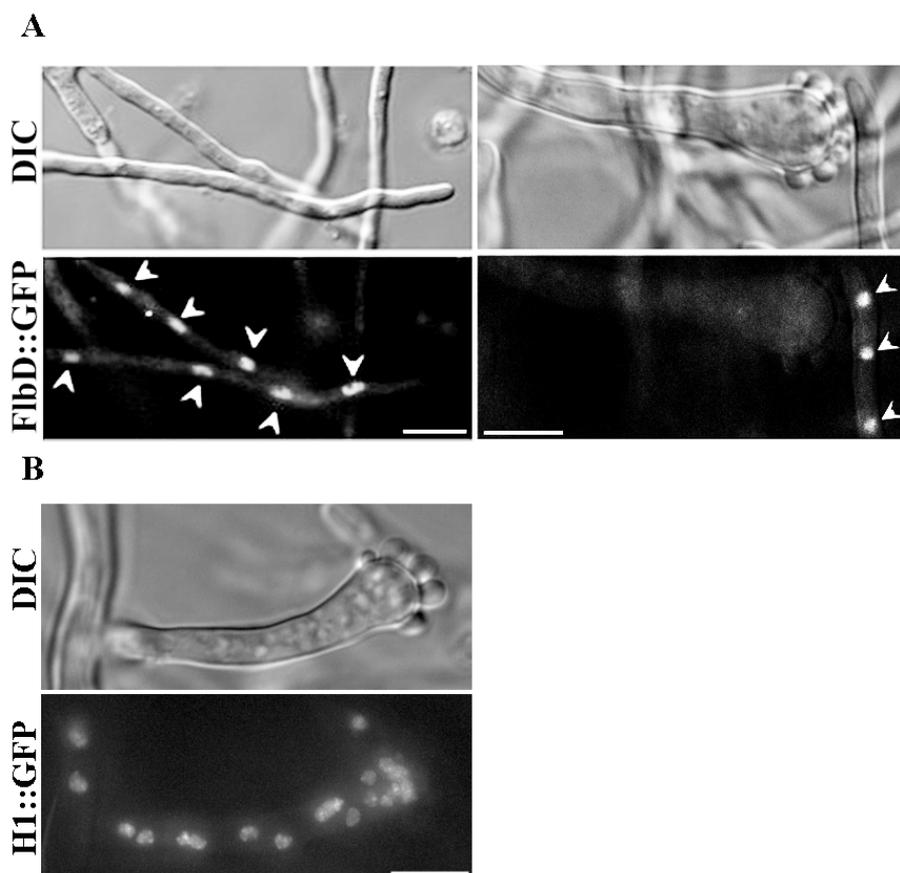


Fig R1.4. A) Localización intracelular de FlbD. En cultivos líquidos estáticos la proteína FlbD::GFP se acumula en los núcleos (puntas de flecha). Como se observa en la fotografía de la derecha, mientras que en hifas vegetativas la proteína sigue siendo detectable, en estructuras específicas de la conidiación no se observa fluorescencia. B) A modo control se utilizó la cepa generada previamente en el laboratorio con histona H1 etiquetada con GFP (Etxebeste *et al.*, 2009b) para estudiar la presencia de núcleos en vesículas con mótulas incipientes, observando la acumulación de núcleos. Barra de escala = 10 μ m.

Como era predecible los tres factores de transcripción *UDA*: FlbB, FlbC y FlbD, muestran una localización nuclear. Dado que la inactivación de cualquiera de los tres factores de transcripción causa una reducción total o parcial de la expresión de *brlA* (ver Introducción general), es posible proponer dos modelos generales de regulación. Los factores de transcripción Flb podrían actuar de forma independiente o conjunta, modulando de forma individual o coordinada la expresión del gen maestro de la conidiación. Trabajos genéticos previos que estudiaron los mecanismos de activación de *brlA* situaban al factor FlbD aguas arriba, y en la misma ruta, que FlbB (Wieser & Adams, 1995, Yu *et al.*, 2006), mientras que FlbC fue situado en una ruta paralela (Yu *et al.*, 2006). Estos trabajos sugerían la posibilidad de que *brlA* se activara mediante la convergencia de al menos dos rutas diferentes de regulación. Este aspecto es específicamente tratado desde un abordaje experimental por genética molecular en un capítulo posterior de esta tesis.

2.3. Factores de regulación temprana apicales

Dado que ninguno de los Flb estudiados se localizaba preferentemente en el ápice, cobró un mayor interés el determinar la distribución celular de FlbE, cuya secuencia de aminoácidos aportaba escasa información *per se*. Se generó la cepa BD186 que expresaba una forma de FlbE etiquetada en el extremo C-terminal con GFP. Nuevamente observamos que la cepa *flbE::gfp*, a semejanza de las anteriormente citadas, no manifestaba ningún fenotipo asociado a su capacidad de conidiación (no mostrado). Al estudiar la localización de FlbE mediante el análisis de microscopía de cultivos líquidos estáticos se observó que FlbE::GFP se acumulaba en la punta de la hifa desde la germinación, y que esta localización se mantenía inalterada en las hifas durante el proceso de crecimiento vegetativo (Fig R1.5A). Esta localización apical era prácticamente indistinguible de la que presentaba la cepa FlbB::GFP en sus células vegetativas (Fig R1.5B; (Etxebeste *et al.*, 2008)). Sin embargo, FlbE no fue observado durante el desarrollo del conidióforo lo que contrasta con FlbB, que localiza en los extremos de las mótulas incipientes (Fig R1.5B imagen de la derecha; (Etxebeste *et al.*, 2009a)).

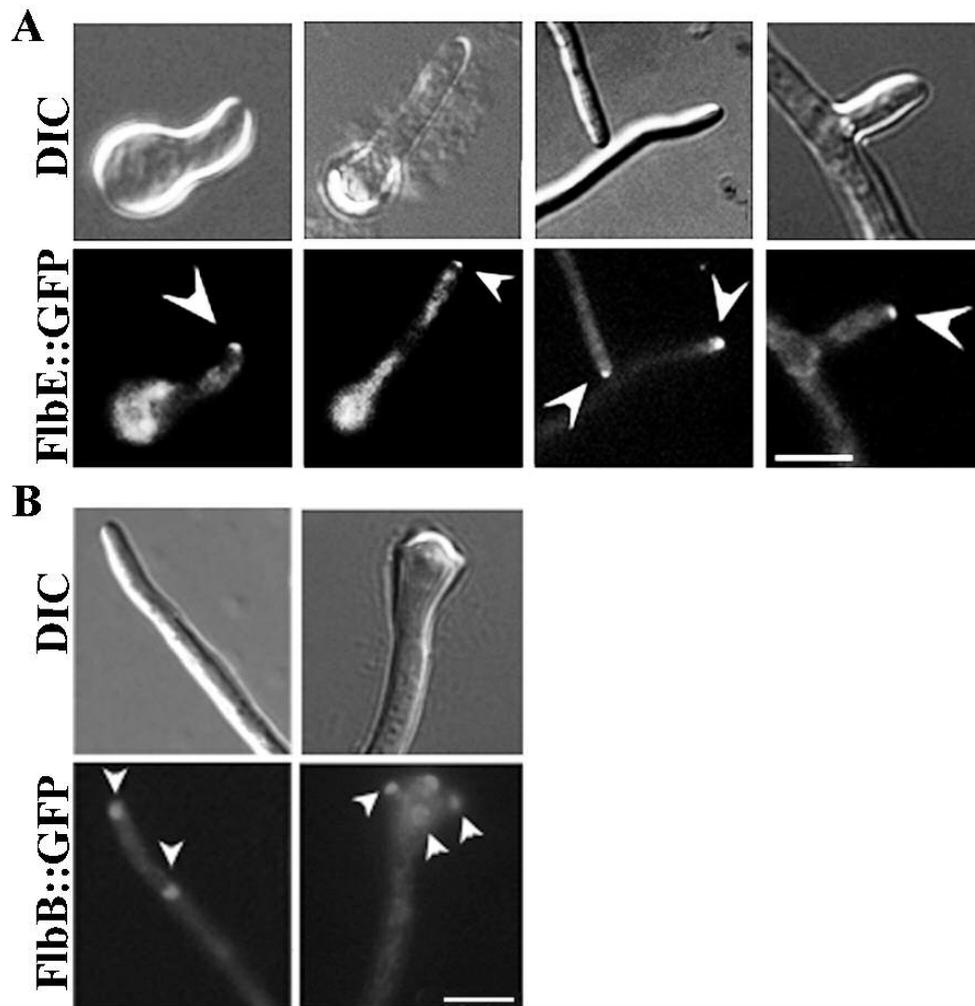


Fig R1.5. A) Localización intracelular de FlbE (utilizando la cepa *flbE::gfp*). En cultivos líquidos estáticos la proteína se acumula en la punta de la hifa desde la germinación y durante el crecimiento vegetativo (puntas de flecha). B) Localización intracelular de FlbB en hifas vegetativas y células especializadas del desarrollo (métulas) (Etxebeste *et al.*, 2008, Etxebeste *et al.*, 2009a). Barra de escala = 10 μ m.

Con el objeto de corroborar que ambas proteínas colocalizaban en el ápice de las hifas vegetativas, se generó la cepa BD207 que expresaba conjuntamente GFP::FlbB y FlbE::CR. La conidiación silvestre que mostró la cepa BD207 mostraba la funcionalidad del doble etiquetado, lo que fue corroborado al observar que las localizaciones de cada una de las quimeras eran idénticas a las descritas para cepas etiquetadas individualmente. Así, FlbB se visualizó en el ápice y preferentemente en los núcleos más apicales, como se observa en la imagen de la Fig R1.6, mientras que

FlbE::CR se detectó únicamente acumulado en la punta de la hifa, aunque no se excluye de la región donde se localiza el núcleo, por lo que no podemos concluir que cierta población de moléculas no puedan acompañar a las moléculas FlbB nucleares.

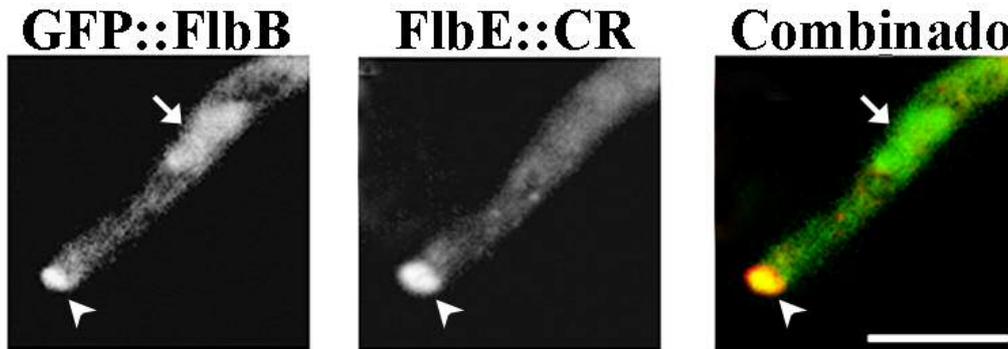


Fig R1.6. Las proteínas GFP::FlbB y FlbE::CR (cepa BD196) colocalizaron en la punta de la hifa durante el crecimiento vegetativo (puntas de flecha). FlbB también localiza en el núcleo más apical de hifas vegetativas (flechas). Barra de escala = 10 μ m.

La presencia de ambas proteínas en la punta de las hifas vegetativas y los fenotipos indistinguibles de las cepas que portan mutaciones de pérdida de función en *flbB* o *flbE* sugieren que ambas proteínas realizan funciones interrelacionadas entre las que podría estar la anteriormente propuesta función sensorial en el ápice. Este aspecto se aborda de manera monográfica en el próximo capítulo.

En resumen, a lo largo de este capítulo y como consecuencia del estudio realizado sobre los reguladores tempranos de conidiación, se han obtenido evidencias sobre diferentes puntos de interés cuya aproximación experimental ha dado lugar a los diferentes capítulos de esta tesis. La presencia de los tres factores de transcripción Flb en los núcleos de las hifas durante el crecimiento vegetativo sugería un mecanismo coordinado de regulación transcripcional, al menos, sobre la activación del gen *brlA* antes del proceso de desarrollo de diferenciación asexual. Por otro lado, el hecho de que el factor FlbE colocaliza en la punta de la hifa con el factor de transcripción FlbB, abre la puerta a la posible formación de un complejo señalizador en el ápice de la hifa.

***PARTICIPACIÓN DE
FACTORES DE
REGULACIÓN
TEMPRANA EN LA
PUNTA DE LA HIFA***

1. Introducción

La ya mencionada localización apical de FlbB (Etxebeste *et al.*, 2008) llevó a considerar la posibilidad de que existiera un mecanismo señalizador localizado en la punta de las células vegetativas que regularía el inicio del desarrollo asexual. Una posible hipótesis era que el factor de transcripción FlbB podría recibir una señal en el ápice y posteriormente migrar al núcleo para desarrollar allí su función como regulador de la expresión génica, en este caso preferentemente en el núcleo más apical.

FlbE es el único de los *UDAs* que colocaliza en la punta de las hifas vegetativas con FlbB. Por lo tanto, esta proteína, de la cuál no se tenía apenas información, cobró una mayor importancia en este sistema regulatorio, ya que podría estar implicada en las funciones de señalización apical. En este capítulo se explora la función de FlbE y su relación con el factor transcripcional FlbB.

2. Resultados

2.1. flbE codifica una proteína específica de hongos filamentosos con dominios conservados de función desconocida

El gen *flbE* fue identificado mediante complementación del fenotipo aconidial del mutante BD13 utilizando una genoteca de ADN genómico insertada en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA1-Not1 (Etxebeste *et al.*, 2008, Osherov *et al.*, 2000).

Para verificar la secuencia codificante (CDS) de *flbE* se procedió a la secuenciación y comparación de los ADN complementario (ADNc) y ADN genómico (ADNg) que fueron amplificados usando cebadores específicos (tabla M&M2). Se obtuvieron secuencias nucleotídicas idénticas a las publicadas en las bases de datos *Broad Institute Database* y *Aspergillus Genome Database*. La secuencia codificante de *flbE* posee 682 pb, contenida en dos exones separados por un intrón de 73 nt (Fig R2.1). La proteína codificada por el ADNc secuenciado consta de 202 amino ácidos, con un peso molecular y un punto isoeléctrico estimados de 23,1 kDa y 4,28, respectivamente. Las búsquedas por similitud de secuencia de aminoácidos en bases de datos *Pfam* no facilitaron la identificación de dominios funcionales conocidos.

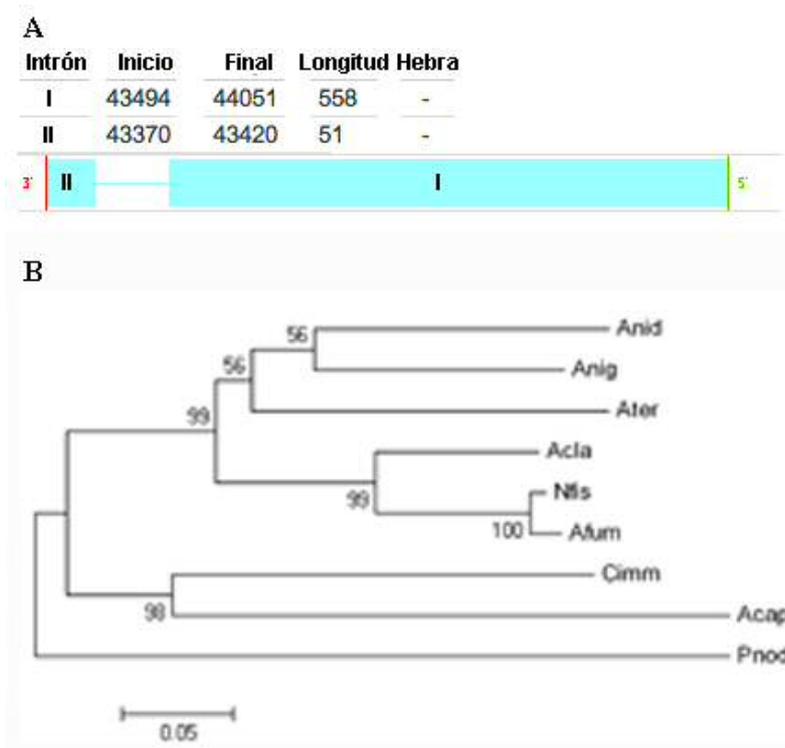


Fig R2.1. Descripción general de *flbE*.

A) Distribución de exones e intrones en *flbE*.

B) Árbol filogenético de los homólogos de *flbE*. Abreviaturas: Anid, *A. nidulans*; Anig, *A. niger*; Acla, *A. clavatus*; Nfis, *Neosartorya fischeri*; Afum, *A. fumigatus*; Ater, *A. terreus*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Acap, *Ajellomyces capsulata*; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum*.

Las búsquedas realizadas en otras bases de datos de ADN genómicos o de proteínas utilizando programas como Blastn, tBlastx o Blastp mostraron la presencia de posibles ortólogos en otros hongos con capacidad conidiante, como pueden ser otras especies de *Aspergillus*, como *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, el estrechamente relacionado *Neosartorya fischeri*, así como otros hongos filamentosos como *Phaeosphaeria nodorum*, entre otros (Fig R2.1 y 3.2). Sin embargo, no se encontraron homólogos en genomas de hongos levaduriformes ni en eucariotas superiores.

Alineamientos de las secuencias proteicas más similares a FlbE revelaron la presencia de dos regiones conservadas que fueron denominadas A y B (Fig R2.2). Las regiones A y B poseen un alto contenido de residuos hidrofóbicos (48% de un total de 93 residuos y 52% de un total de 25, respectivamente), separados por una región no conservada, que definimos como un enlace o “linker”. La región C-terminal de la

proteína contigua a la región B contiene un segmento rico en residuos ácidos (66% de un total de 24).

En este aspecto se realizaron estudios más detallados en nuestro laboratorio utilizando técnicas bioinformáticas avanzadas (Cortese *et al.*, 2011). Se identificaron un total de 40 ortólogos de *flbE* en otras tantas especies fúngicas en las que también se localizaron ortólogos de *flbB*. La identificación de posibles motivos funcionales mediante el análisis de regiones conservadas sugirió una predicción similar a la mostrada en esta tesis. Se describieron también dos dominios separados por un “linker”, así como una región ácida en el extremo C-terminal. En este análisis más detallado, la denominada región A se pudo dividir en 4 subdominios. Al no ser el tema principal de la tesis, estos estudios no serán presentados en detalle (Cortese *et al.*, 2011).

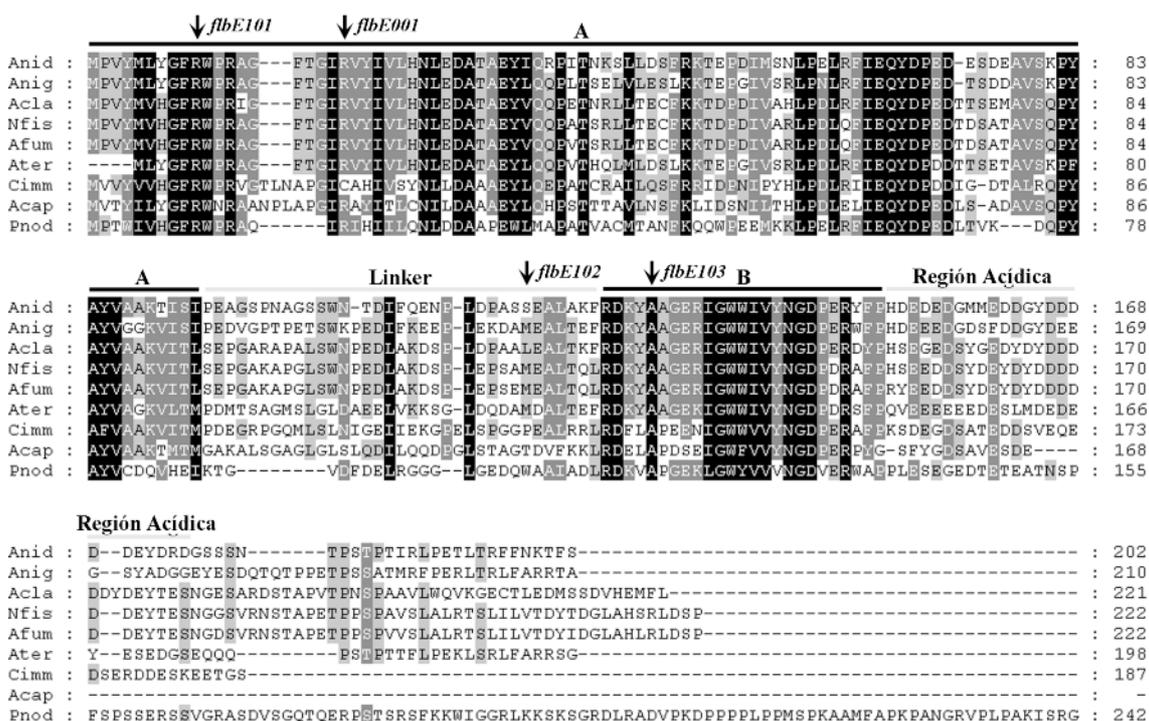


Fig R2.2. Alineamiento de supuestos homólogos de *flbE* en diferentes hongos filamentosos. Se utilizó el software Genedoc (version 2.6.003; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Abreviaturas: Anid, *A. nidulans*; Anig, *A. niger*; Acla, *A. clavatus*; Nfis, *N. fischeri*; Afum, *A. fumigatus*; Ater, *A. terreus*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Acap, *Ajellomyces capsulata*; Pnod, *P. nodorum*. Diagrama de los dominios conservados.

Para asignar una posible función a las regiones conservadas en el gen *flbE*, se procedió a caracterizar molecularmente a los diferentes mutantes aislados. En primer lugar, tras identificar el *locus* que complementaba el fenotipo aconidial del mutante BD13 se procedió a secuenciar el gen *flbE* en dicho mutante. La mutación, que se denominó desde entonces *flbE001* (Fig R2.2; Tabla R2.1) causaba un truncamiento de la proteína en el aminoácido 27. Dado que el truncamiento se encontraba cercano al inicio de la secuencia, éste podría considerarse como un alelo nulo. Más adelante en el desarrollo de esta tesis doctoral se demuestra que efectivamente este es el caso (ver sección 2.2 de este capítulo).

Los experimentos de etiquetado de FlbE con GFP (apartado 2.3 del capítulo anterior; Pag 68) dieron lugar a tres nuevos mutantes, procedentes, seguramente, de errores espontáneos introducidos durante el proceso de la amplificación por técnicas de PCR del fragmento de ADN utilizado en el experimento de transformación. De entre todos los transformantes identificamos tres cepas que mostraron un fenotipo aconidial. Al secuenciar el *locus* recombinante *flbE::gfp* de cada una de estas cepas aconidiales identificamos los siguientes alelos mutantes *flbE101*, *102* y *103*. La secuenciación del ADN correspondiente a la región codificante de cada alelo mostró que *flbE101* también causaba un truncamiento temprano de la proteína, R10Stop (Tabla 3.1); que la proteína mutante FlbE102 tenía una sustitución de la serina en la posición 120 por una prolina: S120P; y que, finalmente, FlbE103 portaba una sustitución de la alanina en la posición 131 por una valina (A131V).

La serina substituida en el alelo *flbE102*: S120P está situada en la región del “linker”, no siendo un residuo conservado entre los posibles homólogos. Es posible que la substitución S120P afecte a un posible residuo susceptible de ser fosforilado o tenga una función estructural, alterando a la flexibilidad del linker. La completa pérdida de función de FlbE102 refleja la necesidad de un “linker” o una región B flexible (Fig R2.2). La mutación en el alelo *flbE103* (Fig R2.2), en cambio, modifica una alanina conservada.

Alelo	Cambio(s) ADN	Proteína mutante	Cambio(s) en la proteína
<i>flbE001</i>	C58T;G59D	1-19+WSTSSCTT	R20W
<i>flbE101</i>	C27T;C28T	1-9	R10STOP
<i>flbE102</i>	T358C	1-202	S120P
<i>flbE103</i>	C391T	1-202	A131V

Tabla R2.1. Mutaciones caracterizadas en este estudio.

2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes en *flbE*

Para poder entender mejor el papel de FlbE durante el crecimiento vegetativo y/o en la producción de las células especializadas del conidióforo, se generó el mutante nulo del gen *flbE* (cepa BD142; Materiales y Métodos 3) y se llevó a cabo una caracterización fenotípica de todos los mutantes frente a una cepa referencia silvestre (TN02A3). El diseño experimental incorporó además del análisis tanto en medio sólido mínimo (MMA) como completo (MCA; ver Materiales y Métodos 2), el estudio de los fenotipos bajo diferentes condiciones de estrés. Se estudiaron limitaciones nutricionales provocadas en medios con agotamiento de carbono (reducción del 80% de glucosa; concentración final 0,4%) o nitrógeno (reducción del 80% de sodio nitrato; concentración final 14mM). También se analizó el efecto que causaba el estrés osmótico (MMA complementado con 0,6M KCl). Estas condiciones ya fueron utilizadas anteriormente para la caracterización de mutantes *flbB* (Etxebeste *et al.*, 2008), por lo que proporcionaron una comparación muy útil entre los nuevos mutantes de *flbE* y el mutante nulo de *flbB*.

En MMA o MCA, la cepa nula *flbE* (Fig R2.3) mostró un fenotipo aconidial. Las cepas portadores de los alelos mutantes de *flbE*, mencionados anteriormente (Tabla R2.1), también mostraron un fenotipo aconidial comparable que contrastaba con la capacidad normal de conidiación en estos medios de cultivo de la cepa silvestre, o de la cepa que expresa la versión de FlbE etiquetada con GFP (*flbE100*). Estos resultados nos permitieron concluir que tanto los mutantes con truncamientos tempranos, como los mutantes con cambios de amino ácidos puntuales daban lugar a la pérdida de función de la proteína FlbE.

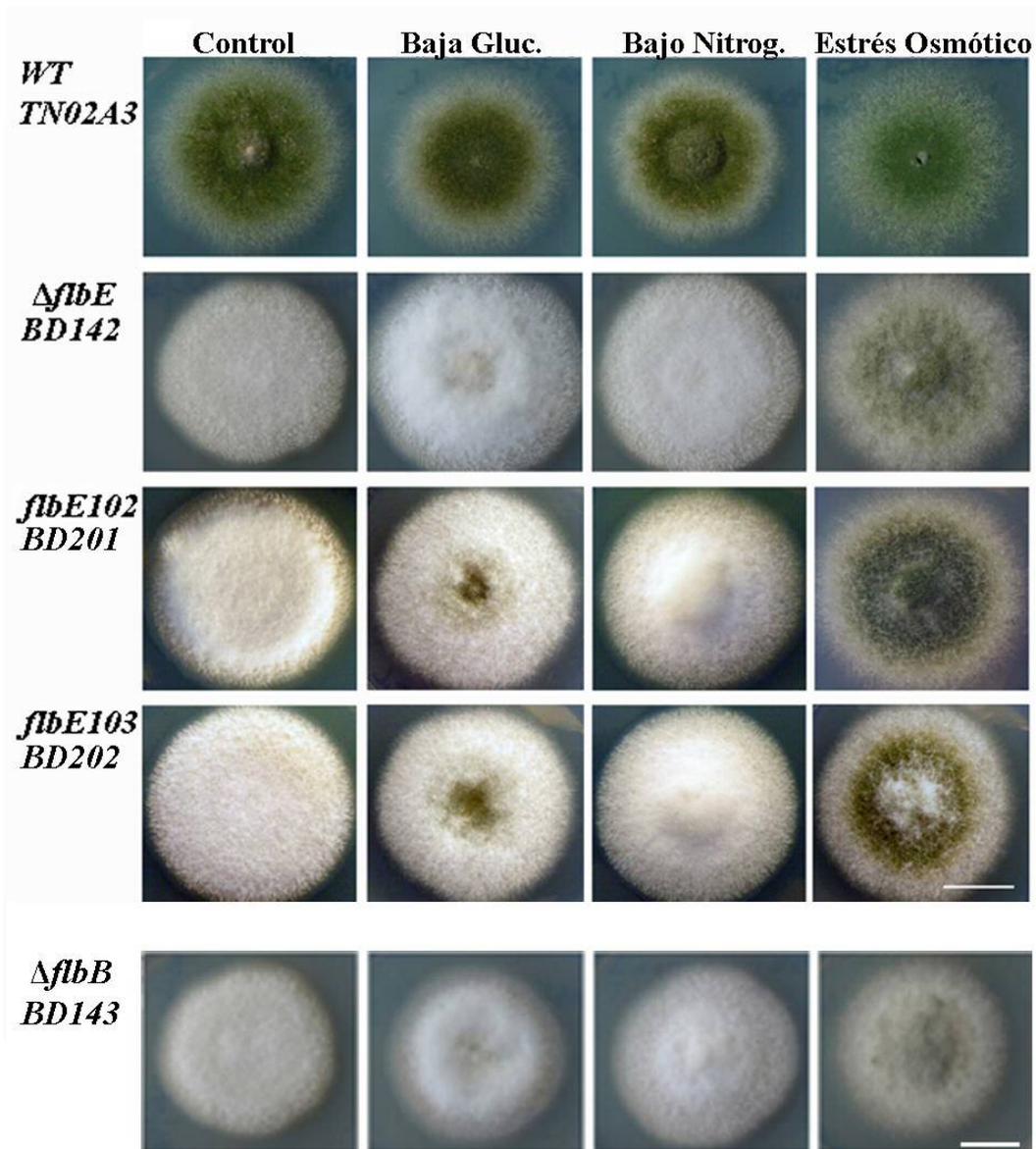


Fig R2.3. Caracterización de los mutantes de *flbE* en medio sólido. Morfología de colonias de las cepas silvestre (WT; TN02A3), $\Delta flbE$ (BD142), *flbE102* (BD201), *flbE103* (BD202) y $\Delta flbB$ (BD143) cultivadas durante 72 horas en medios sólidos MMA, MMA con 0,4% de glucosa, MMA con 14mM de nitrato sódico y MMA con 0,6 M KCl (ver capítulo de Materiales y Métodos). Los alelos mutantes *flbE001*, *flbE::gfp* ó *flbE101* no se muestran. Las cepas mutantes *flbE001* y *flbE101* causan proteínas truncadas en amino ácidos tempranos, mostrando un fenotipo similar al alelo nulo. La cepa *flbE::gfp* no se difirió de la cepa silvestre (WT). Barra de escala = 1 cm.

Ciertas condiciones de estrés ambientales ejercen un efecto positivo sobre la capacidad de conidiación de *A. nidulans* (Skromne *et al.*, 1995). Para determinar si FlbE participa en dicha respuesta se estudió el fenotipo que presentaban los mutantes *flbE* aislados en diferentes condiciones de estrés arriba indicadas. Así, el

estrés inducido por agotamiento de nutrientes tuvo un efecto diferenciado. La reducción de glucosa provocó bajos niveles de conidiación en el centro de la colonia, mientras que una reducción equivalente de la fuente de nitrógeno no indujo ningún cambio apreciable en el fenotipo aconidial (Fig R2.3). En condiciones de estrés osmótico, las colonias mutantes *flbE* produjeron conidióforos en la superficie de un micelio mayoritariamente aéreo e indiferenciado, es decir principalmente “*fluffy*”. Las respuestas observadas en los mutantes puntuales eran indistinguibles de las que se observaron en el mutante nulo de *flbB* (Fig R2.3; (Etxebeste *et al.*, 2008)).

También se estudió el fenotipo de los mutantes *flbE* en cultivos líquidos. En este caso los micelios cultivados durante 18h en medio mínimo fueron transferidos a medios libres de carbono o nitrógeno, o suplementados con KCl (estrés osmótico; 0,6M), y cultivados durante 20h adicionales (Materiales y Métodos 2). Tras este periodo se determinó el fenotipo de cada mutante observando muestras de micelio al microscopio óptico mediante técnica de contraste de fases.

Cuando las diferentes cepas fueron cultivadas en MMA líquido, el micelio mostró un crecimiento vegetativo. Sin embargo, la transferencia a medios libres de fuentes de carbono dio como resultado la producción de conidias directamente desde el ápice de la hifa (conidióforos simplificados), sin producir células especializadas, tanto en la cepa silvestre como en las cepas mutantes (puntas de flecha negras en Fig R2.4). Además, las hifas de las cepas mutantes mostraron un diámetro inusualmente reducido (1,5 μ m, mientras que el diámetro medio de las hifas silvestres alcanza las 3 μ m; Fig R2.4). Este fenotipo es compartido con los mutantes *flbB* (Fig R2.4; (Etxebeste *et al.*, 2008)).

En cuanto a la respuesta observada en un medio líquido sin nitrógeno añadido, la cepa silvestre produjo conidias que se generaban desde conidióforos completos, mientras que el nulo y los demás mutantes de pérdida de función de *flbE* mantuvieron el crecimiento vegetativo (Fig R2.4), mostrando, además, un elevado número de vacuolas en el citoplasma. El estrés salino estimuló la conidiación en la cepa silvestre, mientras que las células de las cepas Δ *flbE* y *flbE*⁻ prosiguieron creciendo en fase vegetativa. En los anteriores mutantes no se observó diferenciación celular, a excepción del mutante *flbE103* que produjo conidióforos defectuosos con méticas anormalmente alargadas (indicado por puntas de flecha blancas en Fig R2.4).

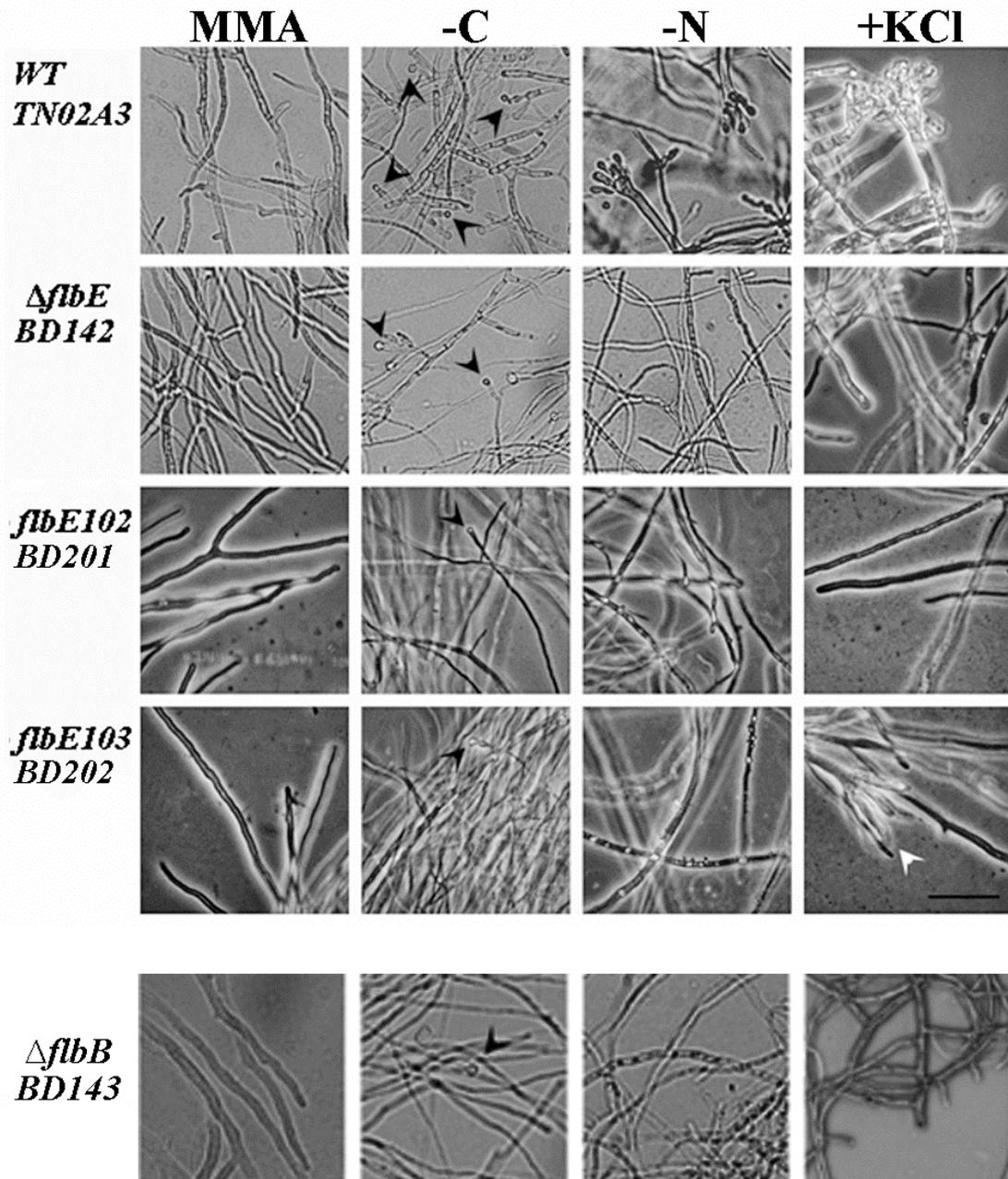


Fig R2.4. Caracterización de los mutantes de *flbE* en medio líquido. Fotografías de micelios de las cepas silvestre (WT; TN02A3), $\Delta flbE$ (BD142), *flbE102* (BD201), *flbE103* (BD202) y $\Delta flbB$ (BD143) cultivadas durante 18 horas en MMA líquido y transferidas posteriormente a medios líquidos MMA, MMA-glucosa, MMA-nitrato y MMA más 0,6 M KCl durante otras 20 horas (ver capítulo de Materiales y Métodos). Las puntas de flecha indican estructuras del tipo conidia. Los alelos mutantes *flbE001*, *flbE::gfp* ó *flbE101* no se muestran. Las cepas mutantes *flbE001* y *flbE101* mostraron un fenotipo similar al alelo nulo. La cepa *flbE::gfp* no se difirió de la cepa silvestre (WT). Barra de escala = 30 μ m.

La combinación de los resultados del análisis fenotípico indicó que el nulo y los alelos mutantes de *flbE* no mostraron ninguna respuesta fenotípica diferenciada bajo diferentes condiciones de cultivo con respecto a los que exhiben los mutantes caracterizados en *flbB* y que también resultan en pérdidas de función del factor transcripcional (Etxebeste *et al.*, 2008). Esto fue interpretado como una nueva evidencia de la posible relación funcional entre FlbB y FlbE.

2.3. FlbE y FlbB son necesarios para la producción de un mismo metabolito necesario para la conidiación

Durante la producción del conidióforo se sintetizan señales extracelulares que inducen la conidiación (Adams *et al.*, 1998). Es conocido que el factor FluG es necesario en la síntesis de una primera señal y al mismo tiempo, se había propuesto que la actividad de los Flb-s daba como resultado la producción de una segunda señal extracelular que actúa aguas abajo de la señal de FluG (ver Introducción general). Para corroborar la existencia de esta segunda señal y su dependencia respecto a los Flb-s se realizaron experimentos de complementación (Materiales y Métodos 2), en los cuales se observó la zona de contacto entre dos cepas inoculadas en MMA, y se analizó la capacidad de revertir extracelularmente el fenotipo aconidial de cada cepa en dicha zona. Al realizar este estudio con los mutantes de *flbE* descritos con anterioridad, se observó que todos ellos siguieron el patrón de complementar a mutantes en *fluG* en las zonas donde ambas cepas estaban en contacto (Fig R2.5).

En contraste con lo observado con el mutante *fluG*⁻, los mutantes de *flbE* y *flbB* eran incapaces de transferirse mutuamente ninguna señal extracelular que complementase sus respectivos fenotipos aconidiales (Fig R2.5), complementación que ocurría, sin embargo, cuando ambos mutantes entraban en contacto con una cepa silvestre. Esta observación se corresponde con la hipótesis planteada de que todos los UDAs son necesarios para la síntesis de una misma señal y refuerza nuestra idea de que FlbB y FlbE, además de coincidir en su localización, actúan en el mismo paso de la ruta de inducción de la conidiación, siendo coherente con el resto de resultados obtenidos hasta ahora.

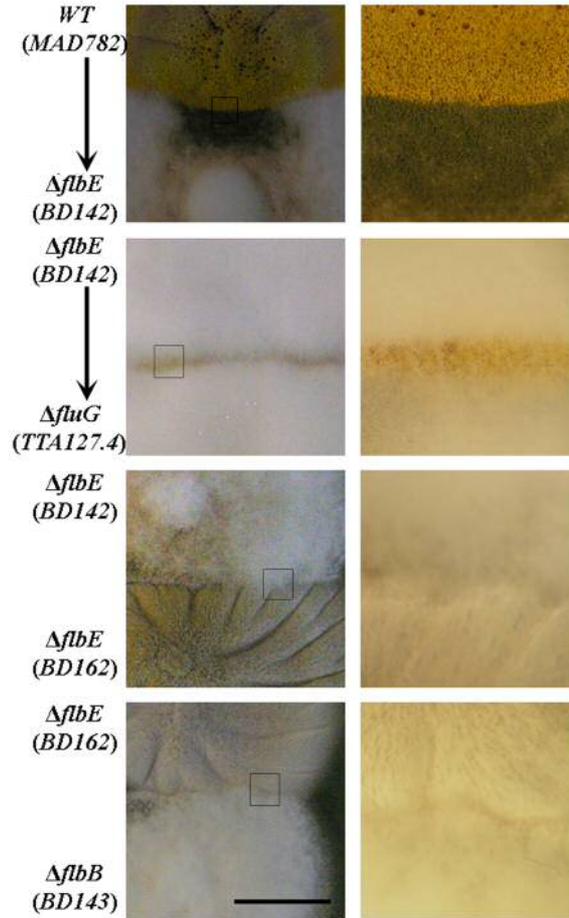


Fig R2.5. Experimentos de complementación extracelular para la inducción de la conidiación. El mutante $\Delta flbE$ (BD142) conidia en la zona de contacto con una cepa silvestre (MAD782) y actúa como donante de la molécula señalizadora sobre una cepa $\Delta fluG$ (TTA127.4). Se observa ausencia de complementación extracelular de la molécula señalizadora en la región de contacto entre $\Delta flbE$ (BD142) y $\Delta flbB$ (BD143). Tampoco hay complementación entre dos cepas $\Delta flbE$ (BD142 y BD162). La fotografías de la columna derecha muestran ampliaciones de las zonas de contacto. La banda amarilla de la segunda fila representa conidias amarillas. Barra de escala = 1 cm para la columna de la izquierda y ampliación de 10x esa columna para las fotografías de la derecha.

2.4. *FlbE* y *FlbB* se asocian en la punta de la hifa durante el crecimiento vegetativo

Los datos obtenidos sobre *FlbB* y *FlbE* en apartados previos nos hicieron plantearnos el objetivo de profundizar en una posible interrelación entre ambas proteínas. Utilizando la fluorescencia como herramienta, analizamos si ambas proteínas podrían ser interdependientes. Por otro lado, las mutaciones obtenidas durante el

proceso de etiquetado de FlbE con GFP (Tabla R2.1), permitieron examinar la localización y el nivel de expresión de proteína intracelular, obteniendo así más datos sobre los posibles dominios funcionales de la proteína.

Para abordar estos objetivos, por un lado se analizó la fluorescencia de los mutantes aconidiales etiquetados con GFP (*flbE102* y *flbE103*, presentados en el apartado 2.1). También se generaron cepas en las que FlbB o FlbE estaban etiquetadas con GFP en un fondo nulo de la otra proteína (cepas BD176 y BD186, respectivamente). De esta manera se estudió la localización de ambas proteínas, comparándola con la localización observada en una cepa silvestre. Estos experimentos se acompañaron con ensayos de Western blot para obtener información acerca de la expresión y estabilidad de las proteínas en la célula de las cepas mutantes.

Las proteínas mutantes FlbE102::GFP y FlbE103::GFP no se acumularon en la punta de la hifa (Fig R2.6A). Para determinar si esto se debía a una pérdida del mecanismo de localización o, por el contrario, a una incorrecta expresión de la proteína, se realizaron análisis de Western blot, en los cuales la proteína actina fue utilizada como control de carga. Las proteínas extraídas de cada cepa cultivada durante 18h en MFA (Materiales y Métodos 2) mostraron unos niveles más bajos de las proteínas FlbE mutantes en comparación con los detectados en una cepa silvestre (Fig R2.6B, líneas 2, 3 y 4). En consecuencia, el fenotipo aconidial de estas cepas mutantes se atribuyó a la deslocalización de FlbE::GFP de la punta de la hifa, seguida posiblemente por una degradación parcial de la proteína.

Las evidencias obtenidas sobre la colocalización entre FlbE y FlbB sugirió que ambas pudieran interactuar directamente formando así un heterocomplejo. La localización de dicho complejo podría ser el resultado de las señales de localización o péptidos señal contenidas en cada proteína Flb o por otro lado ser una de ellas la que dirigiese la localización de la otra. Para distinguir entre estas posibilidades la localización de una de las proteínas fue observada en el fondo genético nulo para la otra. Los resultados mostraron que la acumulación apical de la fluorescencia FlbB::GFP se perdía en un fondo $\Delta flbE$ e incluso no se observó fluorescencia en el núcleo más apical. Cuando se realizó el estudio contrario, analizando la localización de FlbE en un fondo $\Delta flbB$, tampoco se observó ninguna fluorescencia a lo largo de la hifa (Fig R2.6).

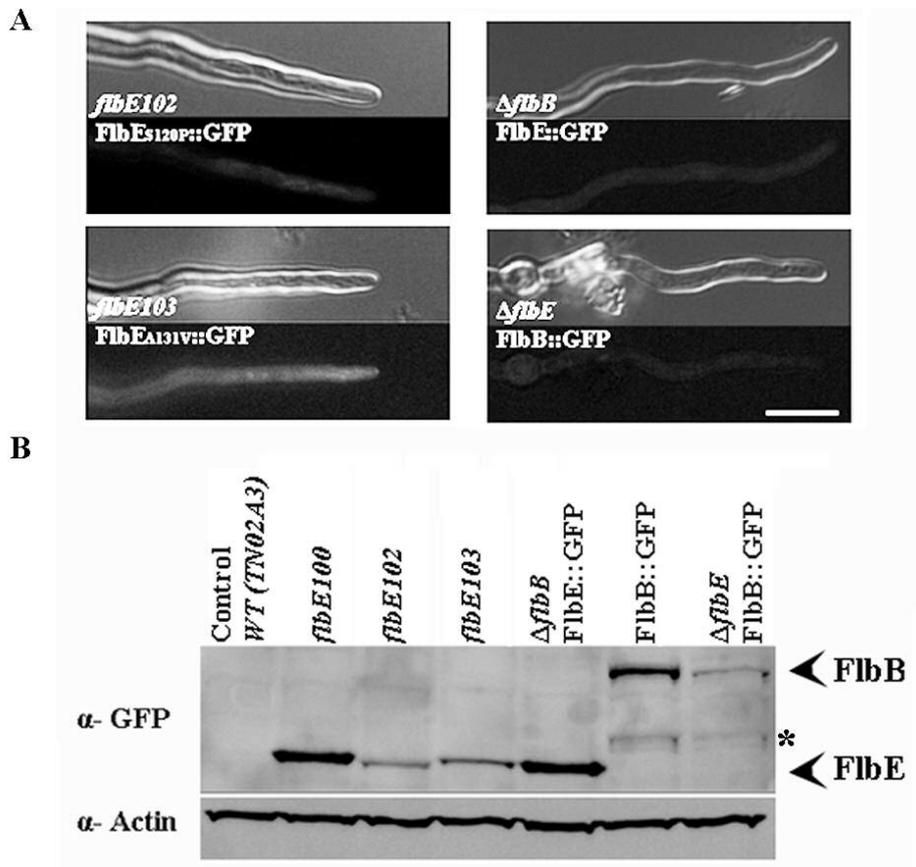


Fig R2.6. A) Localización intracelular de FlbB y FlbE en cepas mutantes: en la columna de la izquierda se muestran los mutantes aconidiales en *flbE*, *flbE102* y *flbE103*. En la columna de la derecha se muestra la localización de las proteínas FlbB y FlbE en el fondo nulo del otro gen (cepas BD176 y BD187, respectivamente). Barra de escala = 10 μ m B) Análisis de Western blot utilizando anticuerpos primarios anti-GFP y anti-actina (control de carga). Las puntas de flecha indican la proteína detectada. Línea 1, TN02A3 (WT, control); línea 2, *flbE100* (FlbE::GFP); línea 3, mutante *flbE102*; línea 4, mutante *flbE103*; línea 5, Δ *flbB* FlbE::GFP (BD186); línea 6, FlbB::GFP (BD167); línea 7, Δ *flbE* FlbB::GFP (BD176). En este experimento se apreció una banda de peso molecular más bajo (indicado con *) que podría indicar la presencia de una forma truncada de la proteína FlbB. Estos análisis se realizaron utilizando una cepa etiquetada con GFP en el extremo C-terminal y un anticuerpo primario anti-GFP. Esto significaría que la nueva banda de FlbB de peso molecular más bajo debería corresponder a un fragmento que hubiera perdido la región N-terminal, región en la que se encuentra el dominio bZip.

Con el objetivo de determinar si la pérdida de acumulación de fluorescencia era resultado de la degradación de las proteínas, se procedió a detectar mediante Western blot a cada una de las proteínas etiquetadas en los extractos proteicos de las cepas antes mencionadas y cultivadas durante 18h en MFA. Estos análisis mostraron que la cantidad de proteína FlbB detectada era notablemente menor en

ausencia de FlbE en comparación con una cepa silvestre (Fig R2.6B, línea 6 y 7). Por el contrario, los niveles de proteína FlbE seguían siendo comparables entre un fondo $\Delta flbB$ y un fondo silvestre (Fig R2.6B, líneas 2 y 5). Estos resultados indicaron que FlbB y FlbE son interdependientes para sus respectivas localizaciones subcelulares, y que la estabilidad de FlbB está afectada en ausencia de una forma funcional de FlbE, pero no al revés.

Ante las evidencias presentadas anteriormente, se procedió a estudiar la posible interacción física entre FlbB y FlbE *in vivo* mediante el sistema de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC; (Takeshita *et al.*, 2008)). Para evaluar esta posibilidad se fusionó la mitad N-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP^N) al extremo N-terminal de FlbB, y la mitad C-terminal de YFP (YFP^C) al extremo N-terminal de FlbE, estando ambas quimeras bajo el control del promotor inducible *alcA*. De esta forma se generaron las cepas que expresaban solamente YFP^N::FlbB (BD224) o YFP^C::FlbE (BD225) a modo de control, y la cepa BD226 que co-expresaba YFP^N::FlbB y YFP^C::FlbE. En los casos en los que sólo se expresaba una de las dos quimeras no se observó fluorescencia alguna (no mostrado). En cambio, la co-expresión de YFP^N::FlbB y YFP^C::FlbE resultó en la reconstrucción de la señal YFP en la punta de la hifa (Fig R2.7), coincidiendo esta localización apical con la que se observó en la cepa doblemente etiquetada (Fig R1.5) y demostrando así la proximidad física entre FlbB y FlbE en el ápice de la célula fúngica.

YFP^N::FlbB, YFP^C::FlbE

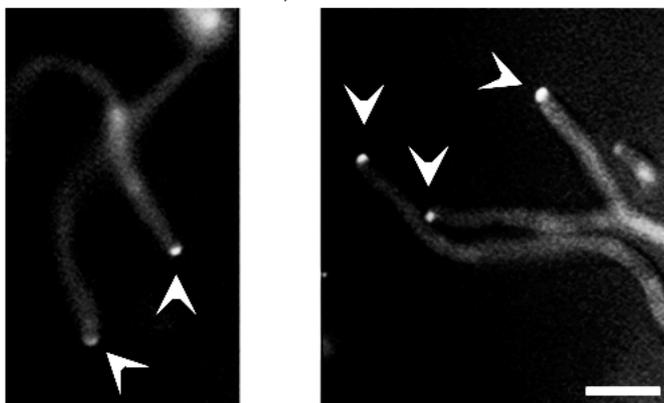


Fig R2.7. Análisis de Complementación de Fluorescencia Bimolecular o BiFC de FlbB y FlbE. En la cepa que co-expresaba YFP^N::FlbB y YFP^C::FlbE fue detectada fluorescencia en la punta de la hifa (puntas de flecha). Barra de escala = 10 μ m

2.5. La localización apical de FlbE y FlbB es dependiente del citoesqueleto de actina

Los anteriores experimentos de epifluorescencia por microscopía suscitaron la cuestión de si la localización de FlbE y FlbB en el ápice de la hifa podría ser dependiente del los citoesqueletos formados por los dímeros de tubulina, microtúbulos, o los filamentos de actina, F-actina.

Para alterar la organización de estos citoesqueletos se utilizaron los compuestos desestabilizantes: benomilo para los microtúbulos y latrunculina B para los cables de actina, siguiendo los protocolos descritos en Materiales y Métodos 8.1. La adición de benomilo a una concentración final de 3 mg ml^{-1} apenas afectó a la localización apical de FlbE o de FlbB tras 5 min de incubación en presencia del desestabilizante, aunque la morfología de la punta mostraba el efecto de la desestructuración de microtúbulos al curvarse y perderse el crecimiento polarizado con el consiguiente abultamiento en la hifa (Fig R2.8B). En cambio, la adición de latrunculina B, a una concentración final $100 \text{ }\mu\text{M}$, causó a los 5 min la deslocalización tanto de FlbB como de FlbE (Fig R2.8C). Este efecto pudo ser revertido tras 5 min de incubación del micelio en MMA libre del desestabilizante (no mostrado). Estos resultados indicaron claramente que la localización apical de ambas proteínas requiere del citoesqueleto de F-actina y que la polarización de FlbB/FlbE debe ser importante para la célula dado que es rápidamente recuperada al reensamblarse el citoesqueleto de actina. Este proceso y el mantenimiento de la polarización del heterocomplejo es energía dependiente dado que ambas proteínas pierden su localización en medio con azida sódica y fluoruro sódico (15mM para cada producto y tras 5 min; no mostrado).

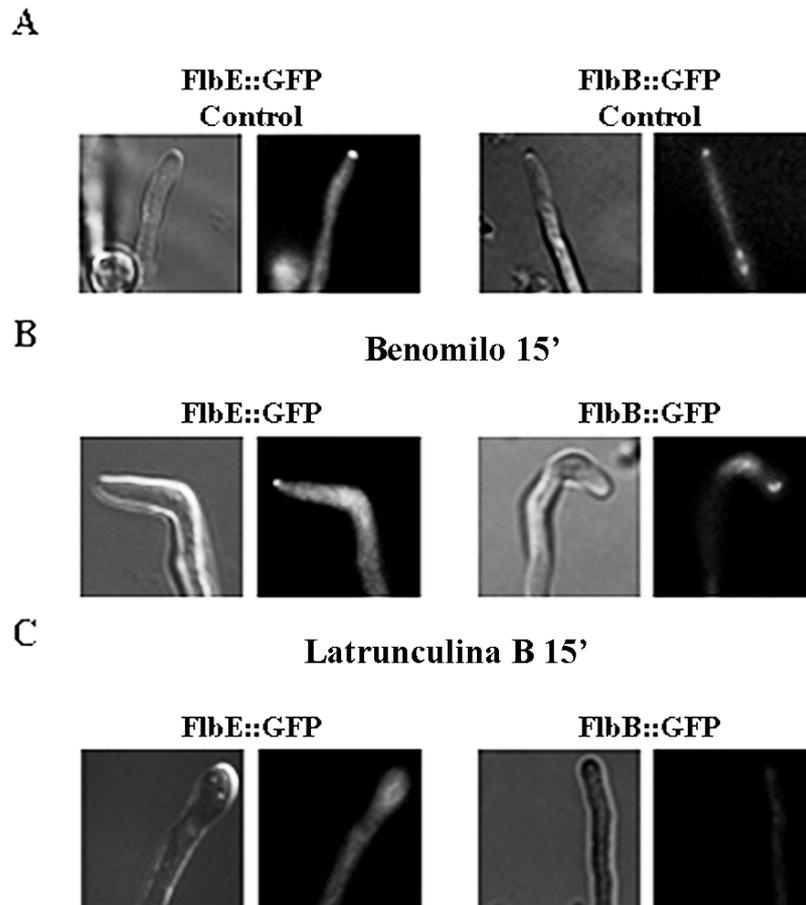


Fig R2.8. Efectos de las drogas desestabilizantes del citoesqueleto en la localización de FlbB y FlbE.

A) Medio control sin ningún componente añadido.

B) En presencia de 3 mg ml^{-1} de benomilo.

C) En presencia de $100 \text{ }\mu\text{M}$ de latrunculina B.

2.6. *flbE* se expresa a lo largo de todo el ciclo vital

La presencia en la célula de las proteínas FlbB y FlbE desde el momento de germinación y a lo largo del crecimiento vegetativo contrastan con una función exclusiva en la inducción del proceso morfogénico de la conidiación. Este hecho nos llevó a analizar el patrón de expresión de los genes *flb* a lo largo del ciclo de vida de *A. nidulans*. La expresión fue analizada tanto durante la fase de crecimiento vegetativo como durante la de reproducción sexual y asexual en una cepa silvestre y para ello se realizaron experimentos de Northern blot. La hipotética interdependencia entre las dos proteínas descrita a nivel de proteína, también fue analizada a nivel transcripcional, observando niveles de expresión de los genes *flbE* y *flbB* en el fondo nulo del otro.

El ARN total de una cepa silvestre fue extraído en condiciones de crecimiento vegetativo o inducción de desarrollo sexual o asexual (protocolo detallado en el apartado de Materiales y Métodos 2). Para poder realizar este experimento e inducir el ciclo sexual se utilizó una cepa con un alelo *veA* silvestre (ver Introducción general). El perfil de expresión de *flbE* en las condiciones analizadas muestra que está presente en todos los estadios del ciclo de vida (Fig R2.9). Hitos como la activación transcripcional de *brlA* que marca el inicio de la formación de esporas no altera el perfil de expresión de *flbE*. Incluso los niveles de expresión de *flbE* son detectables durante el ciclo sexual.

En contraste con el perfil de expresión de *flbE*, la expresión de *flbB* tras ser detectada durante el crecimiento vegetativo y las primeras fases del desarrollo asexual, sufrió una disminución tras la activación de *brlA* (Fig R2.9). Durante el ciclo sexual no se observó expresión de *flbB*.

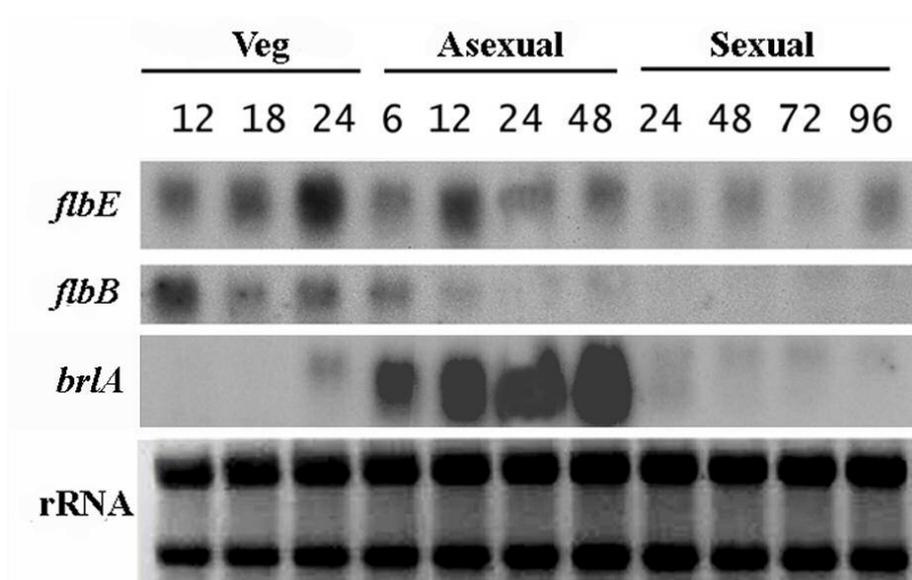


Fig R2.9. Expresión de ARN mensajero de *flbE*, *flbB* y *brlA* durante el ciclo de vida de una cepa silvestre *veA*⁺ (WIN126). Los números indican las horas de incubación en medio líquido, correspondiente a crecimiento vegetativo (Veg) o bajo condiciones de inducción de desarrollo Asexual o Sexual (ver Materiales y Métodos).

De forma similar se realizaron los análisis de expresión de *flbB* y *flbE* en el fondo nulo del otro gen. Dado que solo se exploró el ciclo de crecimiento vegetativo y reproductivo asexual, se utilizaron las cepas que portaban el alelo *veA1*. Los estudios determinaron que la expresión de *flbE* no se veía significativamente alterada en un

fondo nulo de *flbB* (Fig R2.10), como ya sugería el análisis de Western blot (Fig R2.6B, líneas 2 y 5). Sin embargo, a pesar de que FlbE no es estrictamente necesario para la expresión de *flbB*, se observaron niveles de transcripción de *flbB* más bajos en el fondo $\Delta flbE$ (Fig R2.10). Anteriormente se ha descrito (apartado 2.3 de este capítulo) como en un fondo nulo de *flbE* los niveles de proteína FlbB eran más bajos en comparación con una cepa silvestre (Fig R2.6B, líneas 6 y 7). La alteración de expresión de *flbB* podría explicar estos cambios a nivel proteico.

Es preciso mencionar que utilizamos los niveles de expresión del gen de la actina (*acnA*) a modo de control de carga conjuntamente con la imagen de tinción con bromuro de etidio de los rRNAs. Se observó que los niveles de expresión de *acnA* variaban a lo largo del ciclo de vida, pero que para cada estadio los niveles de expresión son comparables en las diferentes cepas.

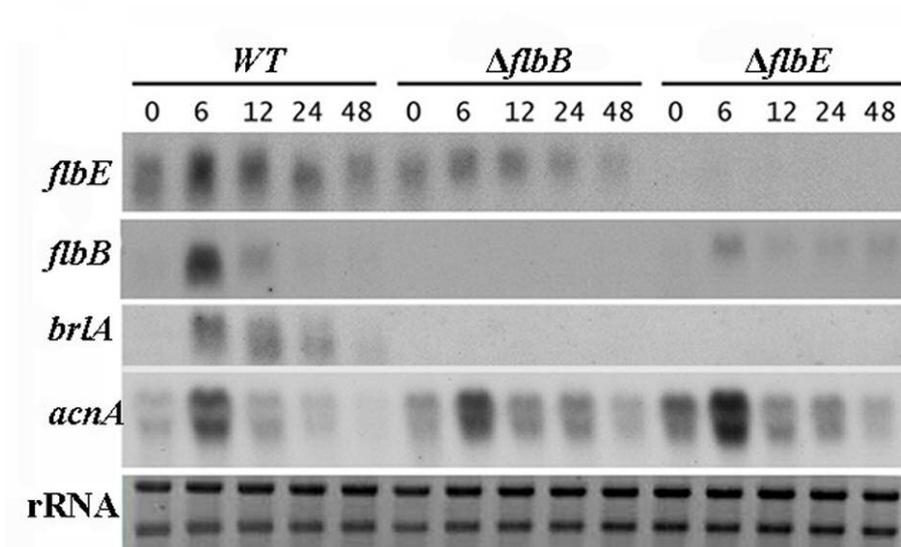


Fig R2.10. Expresión de ARN mensajero de *flbE*, *flbB*, *brlA* y *acnA* (actina, control de carga) en diferentes tiempo durante el crecimiento vegetativo (0) o desarrollo asexual (6, 12, 24, 48 horas), en las cepas mutantes nulas de *flbE* y *flbB* en comparación con una cepa silvestre (WT; TN02A3). La expresión de *acnA* varía a lo largo del ciclo de vida, pero experimentos con diferentes cepas muestran niveles de expresión comparables para cada estadio.

Las expresiones de *flbE* y *flbB* en cepas que portaban el alelo *veA* silvestre o el alelo *veA1* mostraban patrones comparables, por lo que se concluyó que las expresiones de *flbE* y *flbB* no se encuentran bajo el control del regulador de la luz VeA (Fig R2.9 y R2.10, respectivamente; ver Introducción general).

En resumen, estos resultados indican que *flbE* es expresado a niveles relativamente constantes durante el ciclo de vida y que este patrón es independiente de la expresión de *flbB*, el cual disminuye tras la inducción de *brlA*.

Tras observar el efecto que causa la ausencia de estos factores, se analizó la sobreexpresión de *flbE* y *flbB* con el objeto de observar su efecto sobre el fenotipo y poder actualizar así el modelo de la ruta de inducción. Se generaron cepas que expresaran *flbE* bajo el promotor inducible *alcA*, con los cuales se analizó el fenotipo de sobreexpresión de *flbE* en fondos silvestre, $\Delta flbE$ y $\Delta flbB$. Además, se generó la cepa de sobreexpresión de *flbB* en un fondo $\Delta flbE$ y su fenotipo fue también evaluado.

Las cepas de sobreexpresión de *flbE* en un fondo silvestre o un fondo $\Delta flbE$ mostraron un fenotipo conidiante similar a una cepa silvestre. En cambio la sobreexpresión de *flbE* no pudo suprimir el fenotipo aconidial impuesto por $\Delta flbB$, observando idéntico resultado cuando se realizó el experimento contrario y *flbB* fue sobreexpresado en un fondo $\Delta flbE$ (Fig R2.11). Esto situaría a ambos factores en el mismo nivel funcional como factores de inducción temprana o *UDA*, en línea con los experimentos anteriores. Por lo tanto, la posibilidad más razonable es que FlbB y FlbE actúan al mismo nivel en la ruta de señalización de los *UDAs*, inmediatamente antes del factor de transcripción BrlA.

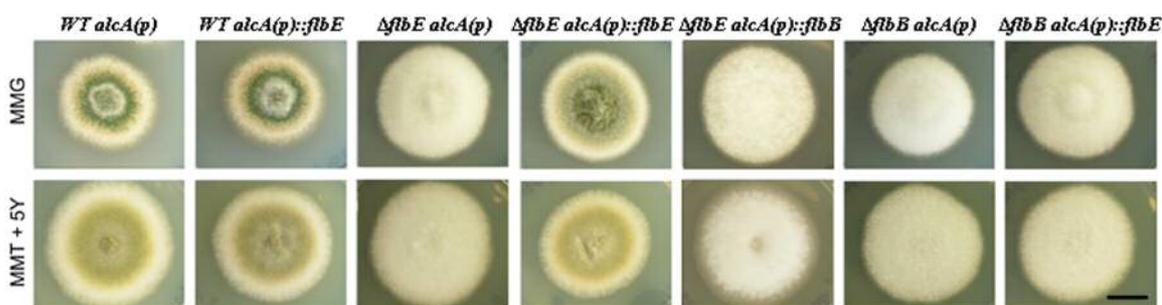


Fig R2.11. Experimentos de sobreexpresión de *flbE* y *flbB* en diferentes fondos genéticos. La sobreexpresión de *flbE* no afecta al fenotipo conidiante de una cepa silvestre (WT). Cepas cultivadas durante 72 horas en MMA más glucosa (MMG; medio no inductor) y MMA más treonina y extracto de levadura (MMT + 5Y; medio inductor del promotor *alcA* con 5 g l⁻¹ de extracto de levadura. Barra de escala = 1 cm.

3. Discusión

Durante el trabajo presentado en este capítulo se caracterizó la relación entre los miembros de la ruta de regulación temprana FlbB (Etxebeste *et al.*, 2008) y FlbE, destacando la interacción entre ambos en la punta de la hifa. Anteriormente, la localización apical de FlbB nos llevó a proponer que este factor podría ser parte de un complejo señalizador de conidiación que colocaliza con la maquinaria de crecimiento polar en la punta de la hifa (Etxebeste *et al.*, 2008, Taheri-Talesh *et al.*, 2008). En este capítulo se ha precisado más sobre la interdependencia funcional entre FlbE y FlbB, y se han aportado nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de un complejo apical.

Los análisis epistáticos que se realizaron en trabajos previos situaron a *flbE* en la misma ruta que *flbB* y *flbD* (Wieser *et al.*, 1994). Los ensayos de sobreexpresión que se realizaron sugirieron que FlbE actuaba en primer lugar en la secuencia FlbE → FlbD → FlbB (Wieser & Adams, 1995). En trabajos posteriores FlbE fue descrito como una proteína con dominios desconocidos y con un papel represor sobre *sfgA* o de los hipotéticos genes SAR (SfgA-Activated Repressors of conidiation; (Seo *et al.*, 2006)).

Durante esta caracterización de FlbE se han obtenido evidencias que confirman la interdependencia funcional entre FlbB y FlbE. Los fenotipos indistinguibles de los mutantes de ambos genes bajo todas las condiciones probadas, así como el bloqueo de la síntesis de un mismo factor señalizador difusible necesario para la conidiación y que actúa aguas abajo del factor dependiente de FluG apoyan aún más la hipótesis. Además, la sobreexpresión de *flbB* no puede suprimir el fenotipo aconidial de $\Delta flbE$ o viceversa. Estos resultados indican que ambos factores actúan en el mismo paso y son interdependientes. La colocalización en la punta de la hifa presentada en el capítulo anterior, la dependencia de FlbB tanto en localización como en estabilidad de una correcta expresión de FlbE y las evidencias de una interacción física añaden pruebas adicionales de que ambos factores son parte de un complejo funcional.

A pesar de su probada relación con FlbB, la función de FlbE no ha podido ser determinada con precisión, aunque el hecho de que la delección de FlbE de lugar a una deslocalización y degradación parcial de FlbB sugiere que una de las posibles funciones de FlbE puede ser asegurar adecuadamente la localización y la función de FlbB en o cerca del *Spitzenkörper*. Los datos también podrían apoyar la hipótesis de que FlbB podría ser transportado desde la punta de la hifa al núcleo más apical. Cuando no puede

localizar correctamente en el ápice, no podría ser transportado al núcleo y ello evitaría su función reguladora. Esto explicaría la anteriormente señalada coincidencia en los fenotipos de los mutantes nulos de ambos factores. Cabe destacar que no se detectó fluorescencia alguna de FlbB o FlbE en el fondo nulo del otro, ni siquiera a lo largo de la hifa en dirección al la punta. Estos resultados podrían sugerir que ambas proteínas se sintetizan en el ápice, siendo transportadas en forma de ARN mensajero e interaccionan directamente en la punta para una correcta localización.

Los estudios con latrunculina B muestran una dependencia sobre el citoesqueleto de actina para la correcta localización de ambos factores, la cual debería ser aclarada en futuros trabajos. A este respecto, es interesante observar que la mutación A131V causa el efecto de deslocalización. Esto se podría considerar como una evidencia preliminar a favor de que la región B de la proteína (Fig R2.2) ejerce un papel en la localización apical dependiente de actina. Por otro lado, la mutación S120P, que se encuentra en la región del “linker” podría interferir con la organización espacial de las regiones conservadas A y B en la proteína, o prevenir la interacción con otro factor implicado en el supuesto complejo. La posible dependencia de la localización de FlbB respecto a los dominios A o B de FlbE (Fig R2.2) también requiere trabajos futuros más detallados.

La presencia de FlbB en la punta de la hifa podría corresponder a una forma específica de la proteína, la cual, tras modificaciones relacionadas con la percepción de estímulos externos, podría ser relocalizada en el núcleo en una nueva forma que promoviese un nuevo programa morfogénético. La forma truncada de FlbB que se muestra en la Fig R2.6B indicaría que la proteína está dividida en por lo menos dos fragmentos, uno que probablemente lleva el dominio de unión de ADN en la mitad N-terminal de la proteína, y otro con la forma truncada observada, que contendría la mitad C-terminal. Un examen más detallado de las modificaciones post-traduccionales que ocurren en FlbB en relación a su distribución celular y dinámica podría aclarar su relación con otras funciones de los *UDA*. La perspectiva que emerge de las pruebas presentadas es coherente con el control de un proceso que implica el cese del crecimiento apical, y el cambio a programas morfogénéticas que implican necesariamente cambios de expresión génica a nivel nuclear.

Dadas las implicaciones de los resultados obtenidos, la existencia de un supuesto complejo en la punta de la hifa que ejerce control sobre la activación de un programa

morfo-genético alternativo sale reforzada. Así, aparece una nueva perspectiva sobre el *Spitzenkörper*, no actuando únicamente como centro de reparto de vesículas requerido para el crecimiento (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995), sino también como centro que integra señales ambientales y endógenas, y coordina las maquinarias requeridas para la activación o represión de diferentes programas morfo-genéticos.

**INTERRELACIÓN
ENTRE LOS FACTORES
DE REGULACIÓN
TEMPRANA Y LA RUTA
CENTRAL DEL
DESARROLLO**

1. Introducción

Los factores de inducción temprana o *UDAs* regulan los procesos tempranos relacionados con la generación del conidiófono y participan en la activación y/o modulación de la ruta central de conidiación (Seo *et al.*, 2006). Los trabajos presentados en capítulos anteriores indican que FlbE y el factor de transcripción tipo bZip FlbB participan de forma interdependiente en un complejo apical (trabajo recogido en (Garzia *et al.*, 2009)). FlbC y FlbD también son supuestos factores de transcripción tipo dedos de zinc clásicos C₂H₂ y cMyb, respectivamente (Wieser *et al.*, 1994, Wieser & Adams, 1995, Yu *et al.*, 2006). Los trabajos de epistasia y sobreexpresión que se realizaron con anterioridad (Wieser & Adams, 1995) sugirieron un posible orden de funciones FlbE → FlbD → FlbB, con FlbC siguiendo una ruta paralela, y todos ellos se consideraron candidatos a regular directamente la expresión de *brlA* (Yu *et al.*, 2006).

La co-localización nuclear durante el crecimiento vegetativo de FlbB, FlbD y FlbC mostrada en el capítulo sobre la localización de los *UDAs* de esta tesis (Pag 65) reforzó la idea de que los tres factores de transcripción podrían ejercer un papel en la activación del gen maestro *brlA*. Se propusieron dos posibles modelos de regulatorios de *brlA*. En el primero, cada uno de los factores transcripcionales Flb actuaría de forma independiente entre sí modulando de forma conjunta la expresión de *brlA*. Dado que cada factor tiene módulos de unión a ADN diferentes, era previsible que reconocieran secuencias diferentes en el promotor de *brlA*. El segundo modelo contemplaba un efecto combinado pero interdependiente en el que la unión y/o reconocimiento de cada una de las dianas en el promotor de *brlA* fuera consecuencia del efecto coordinado entre FlbB, FlbD y FlbC. En este capítulo se tratará de establecer cuál de los dos modelos es el más probable para la regulación del gen maestro de la conidiación *brlA*.

2. Resultados

2.1. Evidencias de una cascada de señalización no lineal en el desarrollo asexual

Debido a que trabajos previos habían sugerido que FlbD y FlbB podrían actuar en una misma ruta de activación de *brlA*, y tras los resultados obtenidos sobre FlbB en esta tesis, nos propusimos el estudiar en profundidad el papel que ejerce FlbD en la ruta de inducción temprana de conidiación.

Para cumplir este objetivo, en primer lugar se generó el mutante nulo $\Delta flbD$ y se realizó una caracterización fenotípica de esta cepa en paralelo con una cepa silvestre, una cepa $\Delta flbB$ y el doble mutante de ambos, de forma similar a la que se realizó en el capítulo anterior con $\Delta flbE$ (apartado 2.2 del capítulo anterior (Pag 79) y Materiales y Métodos 2). Así, en un medio mínimo sintético (MMA) los mutantes simples $\Delta flbB$ y $\Delta flbD$ produjeron colonias *fluffies* (Fig R3.1A), con una producción de esporas tres ordenes de magnitud más baja que la cepa parental silvestre ($3,5 \times 10^6$ esporas por cm^2 la cepa silvestre y 7×10^3 esporas/ cm^2 ó 8×10^3 esporas/ cm^2 los mutantes $\Delta flbB$ y $\Delta flbD$, respectivamente; Fig R3.1B). Este fenotipo aconidial es característico de los mutantes *flb* como ya se ha visto también en el caso de $\Delta flbE$ (apartado 2.2 del capítulo anterior; Pag 79). Bajo condiciones de estrés, como por ejemplo la reducción de la fuente de carbono (80% menos de glucosa), se observaron bajos niveles de conidiación en las tres cepas mutantes (Fig R3.1), siendo la cantidad de esporas un orden de magnitud más baja que en la cepa silvestre. Sin embargo, esta respuesta de conidiación no fue observada en condiciones equivalentes de reducción (80%) en la cantidad de fuente de nitrógeno (Fig R3.1). Finalmente, bajo condiciones de estrés osmótico (0,6 M KCl) o salino (0,5 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), la cepa $\Delta flbD$ mostró un fenotipo similar al ya descrito para $\Delta flbB$ y $\Delta flbE$ (apartado 2.2 del capítulo anterior; Pag 79), con escasa conidiación sobre una colonia principalmente aconidial.

La cepa mutante doble nula, en cambio, mostró un fenotipo aconidial aditivo (Fig R3.1). Esta última característica no se corresponde con la supuesta ruta lineal en la que participarían FlbD y FlbB, y fue interpretada como una indicación de que el modo de acción de estos factores podría ser interdependiente (no lineal).

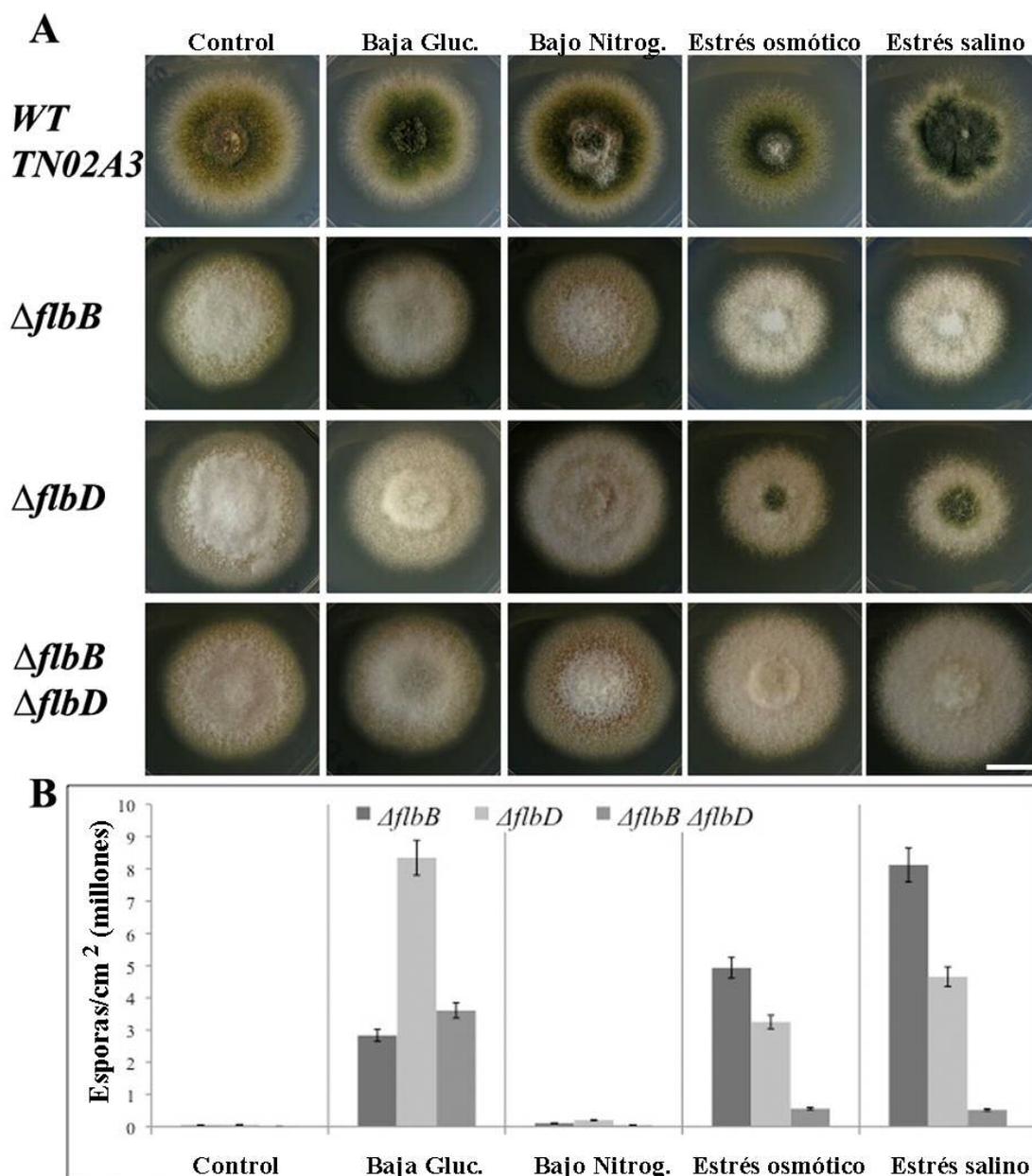


Fig R3.1. Caracterización del mutante nulo *flbD* en medio sólido y comparación con el mutante nulo de *flbB*.

A) Morfología de las colonias de las cepas silvestre (*WT*; *TN02A3*), Δ *flbB* (*BD177*), Δ *flbD* (*BD197*) y doble nulo Δ *flbB* Δ *flbD* (*BD274*) cultivadas en medios sólidos; MMA, MMA con 0.4% glucosa, MMA con 14 mM sodio nitrato, MMA con 0.6 M KCl y MMA con 0.5 M fosfatos (NaH_2PO_4 ; ver Materiales y Métodos). La fotografías están tomadas tras 72 horas de cultivo. Barra de escala = 1 cm.

B) Cantidad de esporas en millones por cm^2 producidas por cada cepa bajo las condiciones de cultivo descritas. El número de esporas de una cepa silvestre (*WT*) se encontraba entre 25 (control) y 100 (estrés salino) millones, y no se muestran debido a las grandes diferencias en el rango en comparación con las demás cepas. Las barras de error indican la desviación estándar de un mínimo de tres réplicas.

2.2. *flbD* y *flbB* muestran patrones de expresión similares a lo largo del ciclo de vida

Con el objeto de establecer posibles relaciones en los perfiles de expresión entre los factores FlbB y FlbD, analizamos la expresión de *flbD* en diferentes etapas de desarrollo y se comparó con el perfil descrito previamente para *flbB* (Fig R2.8; (Etxebeste *et al.*, 2008)). Para ello se realizaron experimentos de Northern blot utilizando ARN total extraído de una cepa silvestre, de forma similar a la realizada para el estudio de expresión de *flbB* y *flbE* (Pag 89).

Se observó que los patrones transcripcionales de *flbD* y *flbB* en las etapas del desarrollo estudiadas eran similares. El transcrito de *flbD* estaba presente durante el crecimiento vegetativo y en las fases tempranas del desarrollo asexual, precediendo a la activación transcripcional de *brlA*. Posteriormente se observó una notable reducción de la expresión de *flbD* (Fig R3.2). Al igual que en el caso de *flbB*, no se detectó expresión de *flbD* durante el desarrollo sexual (Fig R3.2; Fig R2.8).

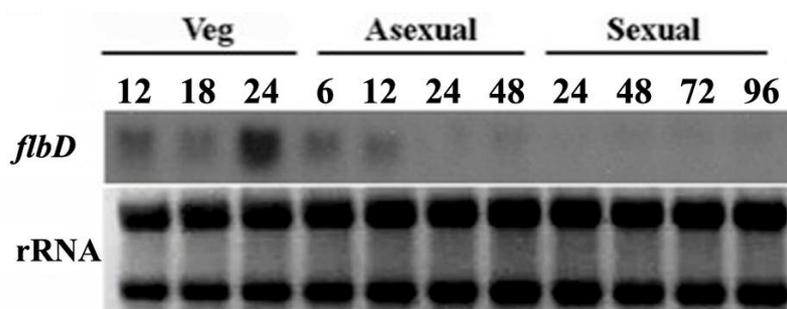


Fig R3.2. Expresión de *flbD* durante el ciclo de vida de una cepa silvestre en fondo genético VeA+. Los números indican las horas de incubación en medio líquido con glucosa, correspondiente a crecimiento vegetativo (Veg) o bajo condiciones de inducción de desarrollo Asexual o Sexual (ver Materiales y Métodos).

2.3. El complejo apical FlbB/E es necesario para la correcta expresión de *flbD*

Los experimentos de epistasia y sobreexpresión situaban a los productos FlbE, FlbD y FlbB en la misma ruta y en ese orden, por lo que FlbD podría actuar como un regulador transcripcional de *flbB* (Wieser & Adams, 1995). Para corroborar este modelo regulatorio con las nuevas herramientas genéticas y moleculares generadas aquí

se analizó la relación existente entre FlbD y el complejo FlbB/E utilizando métodos transcripcionales y estudios de localización y expresión de proteína.

Se realizaron experimentos de Northern blot en los que se analizó la expresión de *flbD* en ausencia del complejo apical y la expresión de *flbB* en una cepa $\Delta flbD$. También se analizó la expresión de ambos genes en ausencia de FluG, activador que se encuentra aguas arriba en la ruta de inducción (ver Introducción general). Para realizar los experimentos de localización y análisis de niveles de proteína se generaron cepas que expresaban la quimera FlbD::CR en fondos $\Delta flbB$ (BD254) y $\Delta flbE$ (BD257) y se etiquetaron con GFP las proteínas FlbB y FlbE en una cepa $\Delta flbD$. Los ensayos de microscopía y Western blot se realizaron siguiendo los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos (M&M6 y M&M8).

Se observó que los niveles transcripcionales de los factores *flb* estudiados no estaban afectados por la ausencia del factor *fluG* (Fig R3.3B). Sin embargo, los niveles de transcrito de *flbD* estaban considerablemente reducidos en las cepas $\Delta flbB$ y $\Delta flbE$ (Fig R3.3A y C). Estos bajos niveles tuvieron un efecto directo sobre la cantidad de proteína FlbD detectada en ensayos de Western blot sobre la proteína FlbD etiquetada con una proteína fluorescente que no pudo ser visualizada en aquellas cepas carentes del complejo FlbB/E (Fig R3.3D).

El perfil transcripcional de *flbB* no se veía alterado en un fondo $\Delta flbD$, mostrando que FlbD no era requerido para la expresión de *flbB* (Fig R3.3B), aunque se pudieron observar niveles de expresión más bajos durante las primeras fases de desarrollo asexual (6 h después de la inducción del desarrollo del conidióforo). En consecuencia, los niveles de proteína de FlbB y FlbE en hifas vegetativas de la cepa $\Delta flbD$ se consideraron comparables con los encontrados en una cepa silvestre (Fig R3.4A), y las localizaciones de ambas proteínas (Fig R3.4B), FlbB (nuclear y apical) y FlbE (apical) no se vieron afectadas.

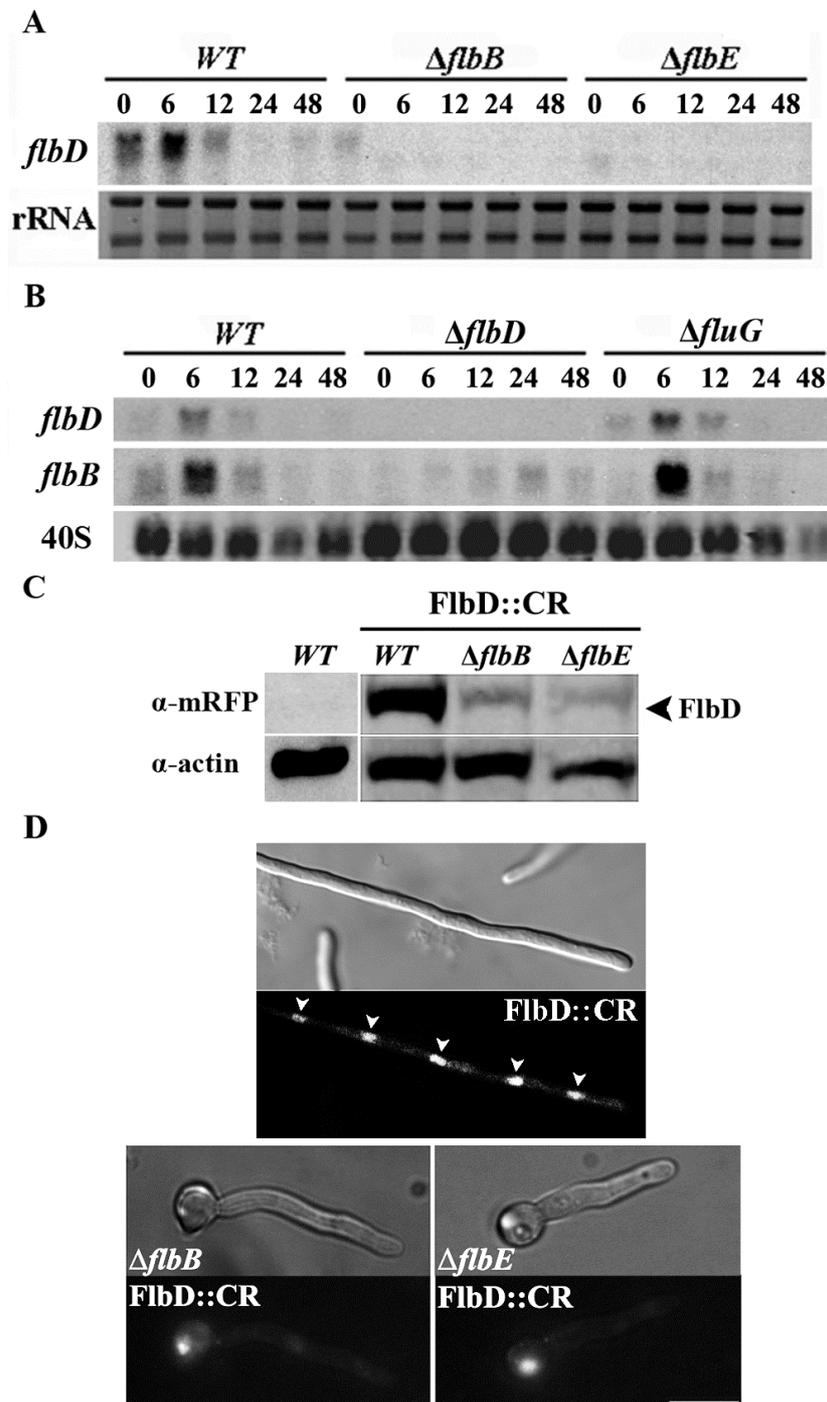


Fig R3.3. Relación entre niveles de transcripción y traducción entre FlbD y el complejo FlbB/E.

A) y B) Niveles de expresión de ARN mensajeros a diferentes tiempos durante el crecimiento vegetativo (0) o desarrollo asexual (6, 12, 24 y 48) en diferentes mutantes nulos en comparación con una cepa silvestre (*WT*).

C) Análisis de Western blot utilizando anticuerpos primarios anti-mRFP o anti-actina.

D) Localización intracelular de FlbD en mutantes nulos de *flbB* y *flbE* (cepas BD254 y BD257). Se muestra la localización intracelular de FlbD en una cepa silvestre (BD250). Barra de escala = 10 μ m

Se realizaron experimentos de *pull-down* para verificar la formación del complejo apical y su estabilidad en ausencia de FlbD. Para cumplir dicho objetivo se expresó en *E. coli* la proteína de fusión GST::FlbB generada previamente y se estudió *in vitro* su capacidad de co-precipitar la proteína FlbE::GFP expresada en *A. nidulans* (protocolo detallado en Materiales y Métodos 6.3). Utilizando diferentes cepas que expresaban FlbE::GFP pudimos analizar la formación del complejo en una cepa silvestre, una cepa $\Delta flbD$ y en las cepas mutantes FlbE102 y FlbE103.

En estos experimentos se demostró que la proteína GST::FlbB tenía la capacidad de co-precipitar la proteína FlbE::GFP endógena (Fig R3.4C, líneas 1 y 2). Al mismo tiempo se ratificó que la formación del complejo FlbB/E no dependía de la ausencia de FlbD, dado que GST::FlbB seguía interaccionando con FlbE::GFP (Fig R3.4C, líneas 7 y 8) en el fondo $\Delta flbD$, tal como indicaba el hecho de que la localización de las quimeras fluorescentes FlbB y FlbE no se veían modificadas (Fig R3.4B).

Por otro lado, se observó que las mutaciones FlbE102 y FlbE103 (Tabla R2.1), que daban como resultado una deslocalización de FlbE de la punta de la hifa (Fig R2.5), interrumpían la interacción *in vitro* de esta proteína con FlbB (Fig R3.4C líneas 3-6). Estos últimos resultados aportaron más datos a cerca de las posibles funciones de las regiones de FlbE afectadas por dichas mutaciones. Al igual que en los experimentos de Western blot, en los experimentos de *pull-down* también se utilizó la actina como control de carga y como control negativo de la coprecipitación el extracto proteico de una cepa silvestre que expresaba FlbE sin etiquetar (TN02A3).

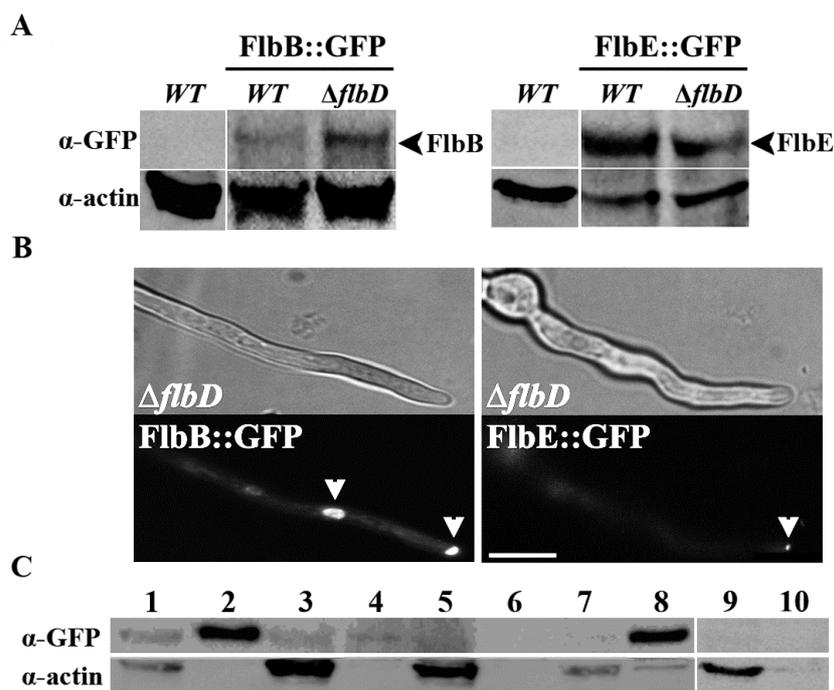


Fig R3.4. Relación proteica entre FlbD y el complejo FlbB/E.

A) Análisis de Western blot utilizando anticuerpos primarios anti-GFP o anti-actina.

B) Localización intracelular de FlbB y FlbE en un mutante nulo $\Delta flbD$ (cepa BD209 y BD208).

Barra de escala = 10 μ m

C) FlbE interacciona específicamente con FlbB en ensayos de *pull-down*. La proteína GST::FlbB purificada fue incubada con el extracto proteico de cada una de las siguientes cepas, mostrando para cada una de ellas la carga (input) y el ensayo *pull-down*, respectivamente: líneas 1-2, *flbE100* (FlbE::GFP); líneas 3-4, *flbE102*; líneas 5-6, *flbE103*; líneas 7-8, BD205 ($\Delta flbD$ FlbE::GFP); líneas 9-10, TN02A3 (WT, control). En los casos de los mutantes en *flbE* se cargó el doble de cantidad de extracto de proteínas con el objetivo de verificar si no ocurría la interacción con FlbB o si está debilitada.

2.4. El factor de transcripción FlbB se une al promotor de *flbD* in vivo

Dado que la expresión de *flbD* es dependiente de FlbB (Fig R3.3A), se consideró la hipótesis de que FlbB realizase su función uniéndose directamente al promotor del gen *flbD*. Resultados previos obtenidos en ensayos de movilidad electroforética (EMSA), mostraron que la proteína de fusión GST::FlbB_{bZip}, que consistía en el dominio tipo bZip de FlbB desde amino ácido K67 al N140 fusionado al epítipo GST, expresada y purificada de *E. coli* era capaz de unirse a fragmentos de ADN con secuencias que contenían dianas de unión específicas descritas para factores tipo bZip (dianas PLD (5'-TTACGTAA) y AP-1 (5'-TTAGTCA));(Etxebeste *et al.*,

2009a)). El análisis de la región promotora de *flbD* (2kb aguas arriba desde el ATG inicial) identificó dos posibles dianas de unión de FlbB, en las posiciones que comprendían desde los nucleótidos -499 a -493 (TCAATAA) y desde -717 a -711 (TCAGTAT) (Fig R3.5A) respecto al sitio de iniciación de la traducción.

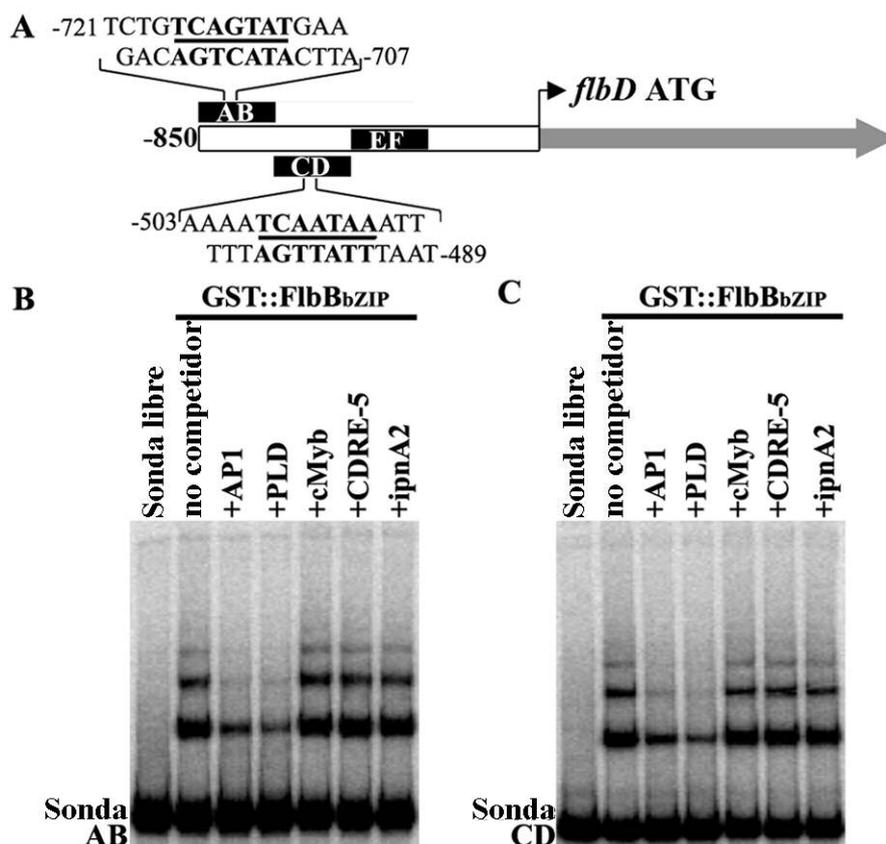


Fig R3.5. Unión de FlbB a regiones promotoras de *flbD*.

A) Búsquedas de secuencias de ADN consensos para factores de transcripción tipo bZip. Se sugirieron dos posibles dianas para FlbB en el promotor de *flbD* (secuencias en negrita y subrayado) en los fragmentos denominados AB y CD. El diagrama indica las posiciones relativas de las dianas y los fragmentos estudiados. Las coordenadas se indican tomando como referencia (posición +1) la A del codón inicial.

B) y C) Geles de movilidad (EMSA) utilizando por cada reacción 250ng de proteína de fusión GST::FlbB_{bZip} y 0,3 ng de sondas marcadas radiactivamente. Todos los competidores fueron añadidos como sondas no radiactivas y en exceso, unas 500 veces más (~150 ng) que la sonda marcada. API y PLD contienen dianas de unión específicas para factores tipo bZip; cMyb contiene diana de unión específica para factores cMyb; CDRE-5 contiene diana de unión específica para el factor de transcripción CrzA (tipo dedos de zinc); y ipnA2 contiene diana de unión específica para el factor de transcripción PacC (tipo dedos de zinc).

Se realizaron experimentos tipo EMSA (Materiales y Métodos 7) utilizando como sonda fragmentos de ADN del promotor de *flbD* que contenían las dianas putativas (fragmentos AB y CD, Fig R3.5A; Materiales y Métodos 7.1) y se observó que la proteína GST::FlbB_{bZip} era capaz de unirse a estos fragmentos del promotor. La especificidad de la unión entre la proteína GST::FlbB_{bZip} y los fragmentos de promotor fue verificada realizando experimentos en los que se competía dicha unión con fragmentos de ADN que contenían dianas de unión específicas descritas para otros factores de transcripción (por ejemplo, para factores de transcripción tipo bZip (AP1 y PLD) Fig R3.5B y C).

Con el objeto de confirmar *in vivo* los resultados de ensayos tipo EMSA obtenidos *in vitro*, se realizaron análisis por Inmunoprecipitación de Cromatina (Chromatin Immunoprecipitation o CHIP). En los ensayos CHIP se analizó la unión *in vivo* de la proteína etiquetada FlbB::GFP a los fragmentos AB, CD y EF del promotor de *flbD* (Fig R3.5A). Se evaluó el enriquecimiento de la fracción precipitada en el fragmento del promotor estudiado, comparando muestras precipitadas con o sin anticuerpos específicos (anti-GFP). La cantidad de fragmento del promotor precipitado se evaluó mediante amplificación por PCR utilizando cebadores específicos (Materiales y Métodos 7.2). Se utilizaron cebadores del promotor del gen *gabA* como control negativo, puesto que no contiene dianas de FlbB y por lo tanto no debería unir a dicho promotor.

Las CHIP confirmaron que FlbB se unía específicamente a los fragmentos AB y CD en el promotor de *flbD* puesto que los productos de PCR estaban enriquecidos (Fig R3.6) y no se detectó unión al fragmento EF (Fig R3.5A) o al procedente del promotor de *gabA* (Fig R3.6), fragmentos estos que carecen de sitios de unión consenso para FlbB. El conjunto de los resultados aportaron pruebas sólidas sobre el papel de FlbB en la inducción de la expresión de *flbD*.

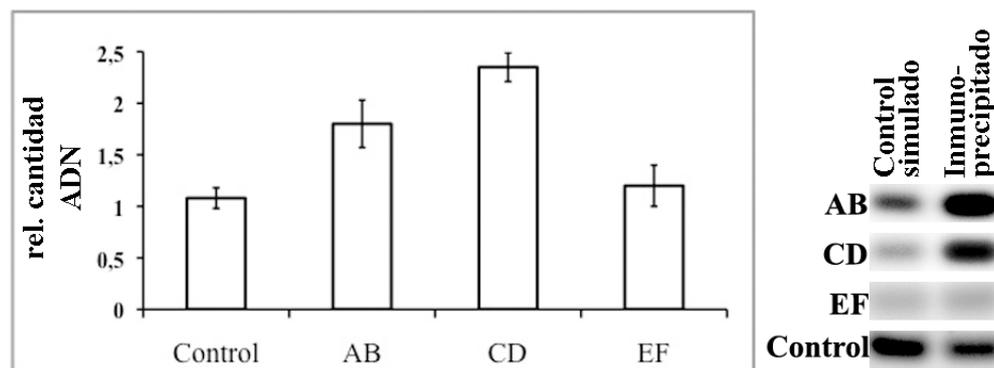


Fig R3.6. Ensayo de ChIP utilizando el anticuerpo anti-GFP directamente contra el FlbB etiquetado con GFP. El ADN inmunoprecipitado fue amplificado con oligonucleótidos específicos para el promotor de *flbD*. Un fragmento del promotor del gen *gabA* fue utilizado como control negativo. La gráfica muestra cantidades relativas de ADN precipitado en comparación con el control simulado (sin anticuerpo). Las barras de error indican la desviación estándar de experimentos realizados por triplicado. Los productos de PCR se representan en un gel de agarosa.

2.5. *FlbD* y *FlbB* se requieren mutuamente para la activación de *brlA*

Vistos los resultados anteriores, valoramos la posibilidad de que pudiera existir un mecanismo según el cual FlbB regularía la expresión de *flbD*, y por tanto, la activación directa de *brlA* sería dependiente de FlbD. De esta manera, y de acuerdo con evidencias anteriores que mostraban la capacidad de esporular en medio líquido de una cepa que sobreexpresaba *flbD* (Wieser & Adams, 1995), esta sobreexpresión debería también suprimir el fenotipo aconidial de $\Delta flbB$, promoviendo así el desarrollo del conidióforo. En cambio, ni la sobreexpresión de *flbD* en el mutante $\Delta flbB$, ni la de *flbB* en el fondo $\Delta flbD$ fue suficiente para suprimir el fenotipo aconidial causado por la ausencia del otro gen (Fig R3.7). Por ello el modelo regulatorio basado en una ruta lineal fue rechazado. Habiendo quedado demostrado que ambas proteínas son necesarias simultáneamente postulamos una acción concertada de ambos factores de transcripción en la regulación de *brlA*.

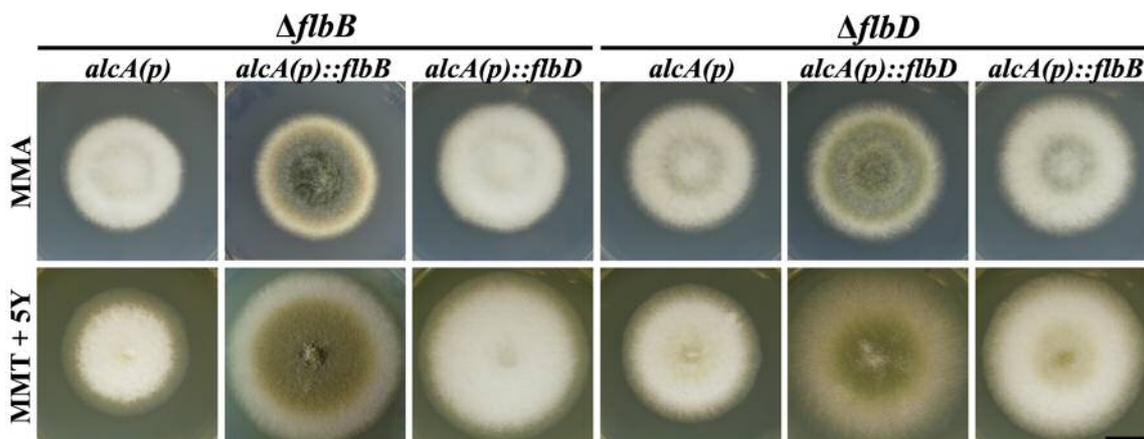


Fig R3.7. Experimentos de sobreexpresión de *flbB* y *flbD* en diferentes fondos genéticos. Las cepas fueron cultivadas bajo condiciones no inductoras para el promotor *alcA*, MMA más glucosa (MMA); y bajo condiciones inductoras del promotor *alcA*, MMA más treonina y extracto de levadura (MMT + 5Y). Este último contenía 100mM L-treonina como inductor y 5g l⁻¹ de extracto de levadura para facilitar el crecimiento. La sobreexpresión fue verificada mediante Northern blot (no mostrado). Las fotografías muestran colonias tras 72h de incubación a 37 °C. Barra de escala = 1cm.

2.6. *FlbD* es un factor de transcripción del tipo cMyb

La comparación de la región correspondiente a los primeros 108 residuos conservados de FlbD y dominios similares en otros factores eucarióticos indicaba la presencia de un dominio de unión a ADN tipo cMyb. Estos factores de transcripción suelen estar compuestos de dos o tres repeticiones de un motivo compuesto por dos α -hélices dispuestas perpendicularmente en el espacio. En este dominio las cadenas laterales de ciertos residuos situados en la segunda α -hélice de cada repetición son las responsables de unir a las bases del ADN, mientras que la primera cumple una función estructural, permitiendo la introducción de la segunda α -hélice en el surco mayor del ADN. En el caso de FlbD, la región descrita contiene dos repeticiones de este tipo (Fig R3.8A).

Se observó que los residuos que habían sido descritos en otros organismos como responsables del contacto directo con el ADN se encontraban completamente conservados, lo que indujo a verificar su funcionalidad utilizando una sonda sintética comercial (Santa Cruz Biotechnology), la cual contenía una diana

consenso para este tipo de factores de transcripción (5'-YAACKG-3'; (Biedenkapp *et al.*, 1988, Ness *et al.*, 1989); Fig R3.8B).

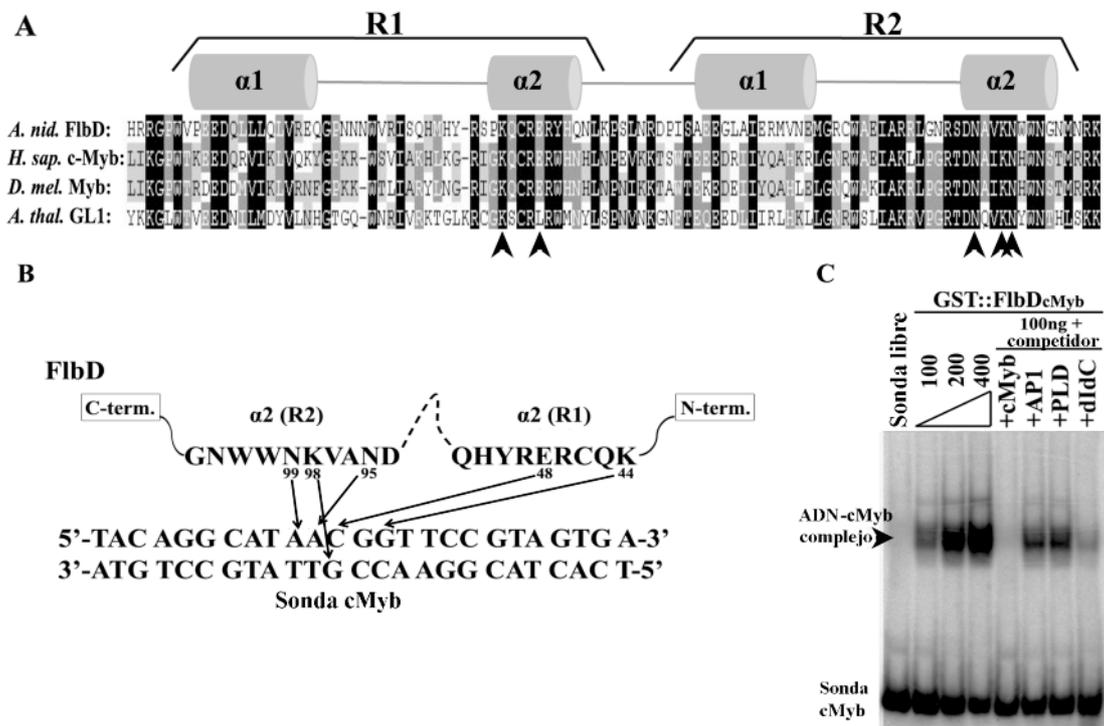


Fig R3.8. Capacidad de unión a ADN del dominio cMyb de F1bD.

A) Representación esquemática y alineamiento de F1bD con varias proteínas tipo cMyb de acuerdo con predicciones anteriores (Wieser & Adams, 1995, Tahirov *et al.*, 2002). El software Genedoc fue utilizado para realizar el alineamiento de las secuencias (versión 2.6.003; <http://www.nrbsc.org/downloads>). Abreviaturas: *A. nid.*, *Aspergillus nidulans*; *H. sap.*, *Homo sapiens*; *D. mel.*, *Drosophila melanogaster*; *A. thal.*, *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas utilizadas para el alineamiento son: ANID_00279.3, AAA52032, NP_511170 y AAL01236, respectivamente. Las puntas de flecha indican los residuos que han sido descritos y que están implicados en el contacto directo con el ADN (ver panel B).

B) Modelo de unión entre la proteína F1bD y la diana de ADN consenso para los cMyb. La representación esquemática muestra los contactos entre bases y amino ácidos (Tahirov *et al.*, 2002).

C) Ensayo tipo EMSA mostrando el reconocimiento específico del dominio cMyb sobre la sonda de ADN consenso (oligonucleótidos GST-F1bD cMyb sense and antisense alineados según se muestra en Materiales y Métodos). Las diferentes cantidades de GST::F1bD_{cMyb} utilizadas se indican en ng. En los experimentos de competición los 100 ng de GST::F1bD_{cMyb} + 0,3 ng de sonda fueron suplementados con 150 ng de fragmentos cMyb, AP1 y PLD. AP1 y PLD contienen dianas de unión específicas para factores tipo bZip; cMyb contiene diana de unión específica para factores cMyb. En el caso de competidor inespecífico poli(dIdC)-(dI-dC) se utilizaron 2 μ g por ensayo.

Una fusión a GST expresando la región entre los residuos M1 y P125 de FlbD, GST::FlbD_{cMyb}, fue generada y utilizada en ensayos tipo EMSA contra la sonda que contenía la secuencia consenso de cMyb. Los ensayos de EMSA se realizaron de forma similar a los mostrados anteriormente (apartado 2.4 de este capítulo). En este caso se utilizaron cantidades crecientes de proteína de fusión y se utilizaron también competidores para analizar la especificidad de la unión. La formación de complejos de retardo confirmaron la presencia de un dominio de unión a ADN tipo cMyb en FlbD y los resultados positivos obtenidos en los experimentos de competencia indicaron la especificidad de dicha unión (Fig R3.8C).

2.7. *FlbB* y *FlbD* unen coordinadamente al promotor de *brlA* in vivo

Para investigar la posibilidad de que FlbB y FlbD regulasen conjuntamente la expresión de *brlA* se procedió a determinar la presencia de dianas para ambos factores en el promotor mediante ensayos de unión a estas secuencias *in vitro* e *in vivo*.

A pesar de que el promotor de *brlA* no contiene secuencias específicas descritas para bZip (apartado 2.4 de este capítulo; dianas tipo AP-1 o PLD; (Etxebeste *et al.*, 2009a)) se encontraron dianas putativas de unión similares a las descritas para FlbB muy próximas a dos supuestos sitios de unión de FlbD. Estas dianas localizan en la región -1600 a -1900 pb desde el ATG inicial de *brlAβ* y por tanto, en la región -2000 a -2400 del ATG de *brlAα* (Fig R3.9A).

Se realizaron ensayos tipo EMSA, utilizando cantidades crecientes de las quimeras expresadas en bacterias GST::FlbD_{cMyb} (apartado 2.6 de este capítulo) o GST::FlbB_{bZip} (apartado 2.4 de este capítulo) y utilizando como sonda una mezcla de fragmentos procedentes de la digestión con diferentes enzimas de restricción de la región promotora de *brlA* (Materiales y Métodos 7.1) que cubrían 3 kilobases aguas arriba desde el inicio del marco de lectura de *brlAβ* (Fig R3.9B diagrama de la izquierda). Las diferentes movilidades presentadas por los fragmentos de distinto tamaño del promotor facilitaron el estudio del ensayo. De esta manera se observó unión de ambas proteínas de fusión al fragmento que contenía las dianas y denominado como fragmento G (Fig R3.9B). Cantidades crecientes de ambas proteínas provocaban una

mayor cantidad de complejo de retardo con dicho fragmento, mientras que la movilidad del resto de fragmentos no se veía alterada.

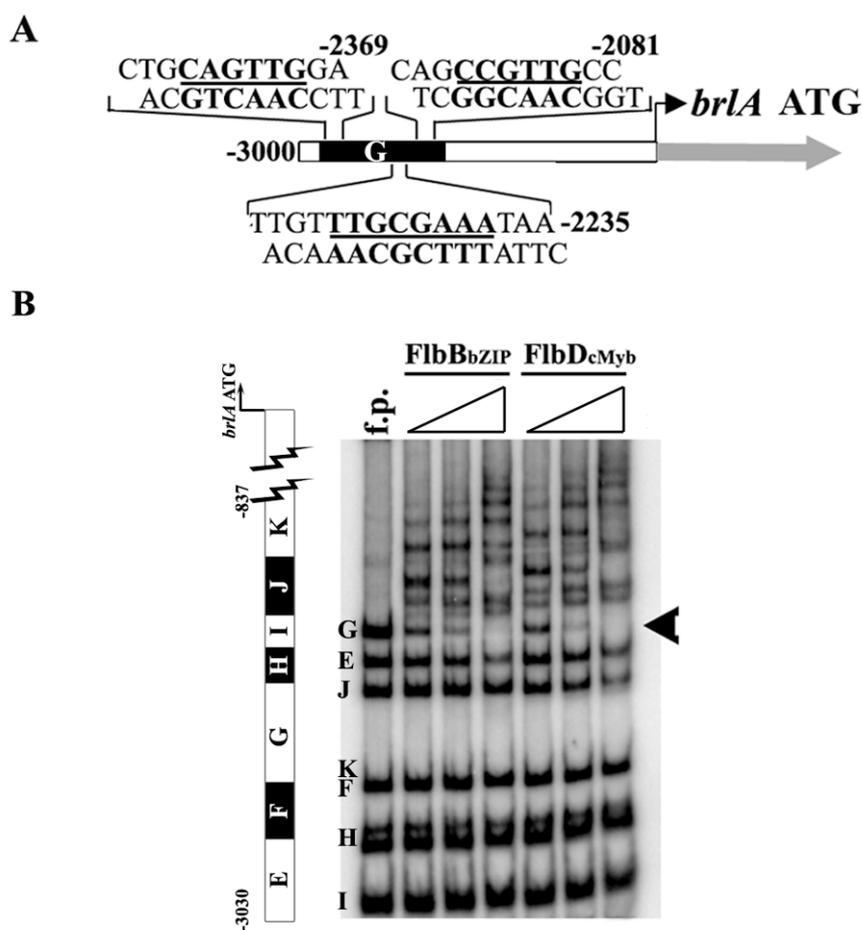


Fig R3.9. FlbB y FlbD regulan conjuntamente a *brlA*.

A) Posibles sitios de unión dentro del fragmento G de FlbD (línea superior) y FlbB (línea inferior). Las coordenadas se indican desde el ATG inicial de *brlA*.

B) Experimentos tipo EMSA utilizando una mezcla de fragmentos marcados radiactivamente que cubrían la región promotora de *brlA* que comprende entre -3030 y -837 desde el codón inicial de *brlA*. El diagrama de la izquierda muestra la posición y el tamaño relativo de cada fragmento. Cantidades crecientes de las proteínas de fusión GST::FlbB_{bZip} y GST::FlbD_{cMyb} fueron utilizadas (250, 500 y 100ng). La punta de flecha indica el fragmento G unido por las dos proteínas.

Para valorar el análisis funcional de esta activación concertada entre factores de transcripción tipo bZip y cMyb sobre el promotor de *brlA*, se llevaron a cabo experimentos de ChIP, midiendo la capacidad de unión *in vivo* de formas etiquetadas de FlbB y/o FlbD a fragmentos específicos de dicha región promotora. Estos ensayos se realizaron de forma similar a la expuesta en el apartado 2.4 de este mismo capítulo,

utilizando en este caso cepas que expresaban FlbB::GFP o FlbD::GFP y cebadores específicos del fragmento G del promotor de *brlA*. Se observó que tanto FlbB como FlbD co-precipitaban de forma específica junto al fragmento del promotor de *brlA* en el cual se encuentran las posibles dianas de unión (Fig R3.10). Los ensayos se realizaron a las 24 h de crecimiento vegetativo, tiempo en el que se empieza a detectar la expresión de *brlA* (Fig R2.8), y reforzaron la hipótesis de que ambos unían específicamente y por tanto podrían activar la expresión de *brlA*. Además, la unión de FlbB al promotor de *brlA* se perdía en una cepa $\Delta flbD$ (Fig R3.10). Este resultado aclaró el papel combinado que ejercen ambos factores de transcripción en la regulación de expresión de *brlA* y sugirió la posible interacción molecular entre ambos. El experimento inverso, en el cual se analizaría la unión de FlbD al promotor de *brlA* en una cepa $\Delta flbB$, no fue posible debido a que la correcta síntesis de FlbD requiere de la expresión de *flbB* (Fig R3.10).

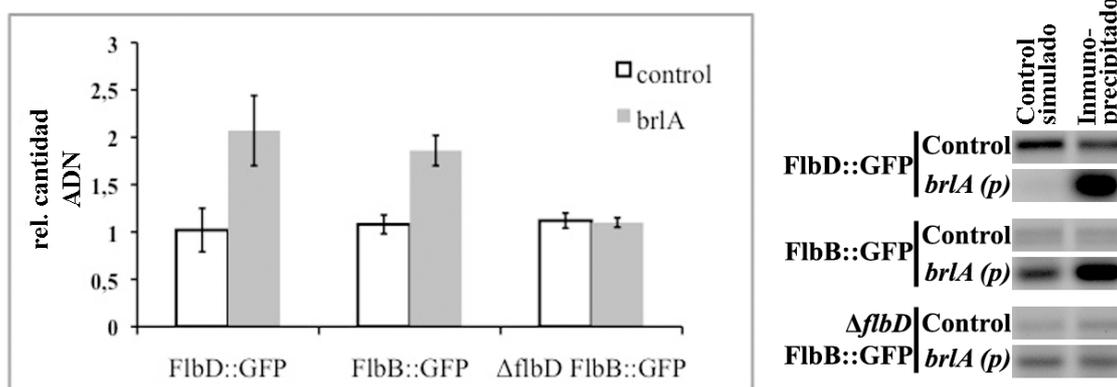


Fig R3.10. Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) utilizando el anticuerpo anti-GFP directamente contra el FlbB o FlbD etiquetados con GFP. El ADN inmunoprecipitado fue amplificado con oligonucleótidos específicos para el promotor de *brlA*. La inmunoprecipitación del fragmento G fue analizada conjuntamente con un fragmento del promotor del gen *gabA* como control. La gráfica muestra cantidades relativas de ADN precipitado en comparación con el control simulado (sin anticuerpo). Las barras de error indican la desviación estándar de experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los productos de PCR se representan en un gel de agarosa.

2.8. La activación de *brlA* no reprime la expresión de *flbB* y *flbD*

Una vez establecida la activación concertada de *brlA* por FlbB y FlbD, y considerando que los transcritos de *flbB* y *flbD* desaparecen poco después de esa

activación (Fig R2.8; Fig R3.2), analizamos si la caída de la expresión es resultado de una represión mediada por BrlA. Esta hipótesis era plausible ya que en las regiones promotoras de ambos factores se encontraron sitios BRE [Elementos de respuesta a BrlA o *BrlA response elements*; (C/A)(G/A)AGGG(G/A); (Chang & Timberlake, 1993)]. Se encontró una posible diana en el promotor de *flbB* situado en el nucleótido -1455 desde el inicio del marco de lectura, y dos posibles dianas en el promotor de *flbD* en los nucleótidos -259 y -440. Para estudiar la regulación de la transcripción de *flbB* y *flbD* por *brlA* se generó una cepa que expresaba a *brlA*, en su forma *brlA $\alpha\beta$* , dirigido por el promotor inducible de la alcohol deshidrogenasa I, *alcA(p)*, permitiendo así una expresión independiente de los factores *UDA*.

Los análisis de Northern blot de micelios cultivados durante 18 h en MMA (condiciones represoras) y posteriormente incubados durante diferentes tiempos tanto en condiciones represoras como de inducción (MMT; MMA + 10 mM treonina) mostraron niveles de transcripción similares tanto para *flbB* como para *flbD* en comparación con la cepa que contenía niveles endógenos de *brlA* (Fig R3.11). Este resultado indicó que la represión de *flbB* y *flbD* no dependía exclusivamente de la acción de BrlA. La implicación de otros factores en este proceso queda pendiente de estudio.

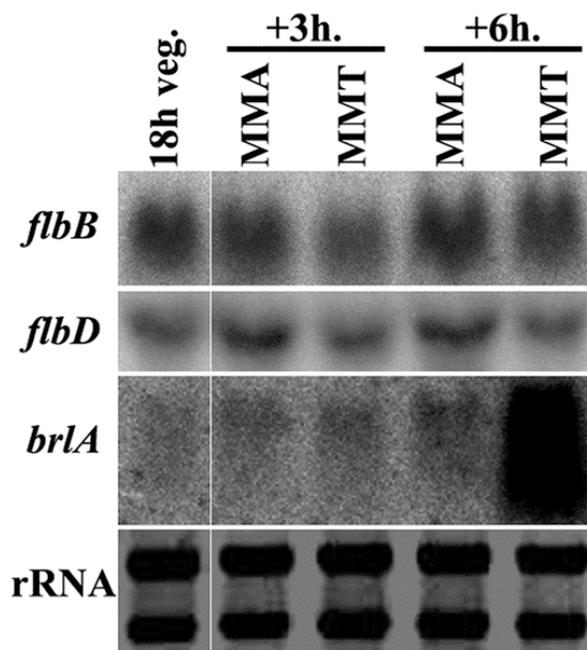


Fig R3.11. Niveles de expresión de *flbB* y *flbD* en una cepa que sobreexpresa *brlA $\alpha\beta$* . El ARN total fue extraído de micelios cultivados bajo las condiciones indicadas arriba. La primera línea, asignada como 18 h veg., indica el ARN de un micelio cultivado en MMA durante 18 horas, el cual fue transferido a un medio no inductor fresco, MMA, y a un medio inductor, MMT. Los números indican las horas transcurridas tras el cambio de medio.

2.9. Primera aproximación a la acción de FlbC en la regulación temprana de la conidiación

Una vez obtenidas evidencias acerca de la función reguladora que ejercían FlbB y FlbD en la activación de *brlA*, se procedió a estudiar a FlbC, que es un factor de transcripción tipo dedos de zinc C_2H_2 del que no se había profundizado en su función en la regulación de *brlA*, más allá de las conocidas para todos los UDAs. Para esclarecer el papel que ejerce este factor en la activación de la ruta central y su relación con los descritos en los apartados previos, se colaboró con el grupo del Dr. Jae-Hyuk Yu, de la Universidad de Wisconsin (EEUU). Los datos más relevantes obtenidos durante esta colaboración se presentan a continuación.

Los mutantes de pérdida de función de FlbC, siendo su máxima expresión el alelo nulo, muestran un fenotipo *fluffy* (Fig R3.12A) como los demás mutantes *flb*. Sin embargo, la caracterización en mayor detalle de este mutante $\Delta flbC$

permitió determinar que, al contrario de lo que ocurría con los mutantes en *flbB*, *flbD* o *flbE*, que muestran un fenotipo aconidial, este mutante sufría un retraso en la formación de los conidióforos y también una menor producción de esporas. Así, los conidióforos eran detectables en la superficie de la colonia tras 5 días de cultivo sólido. De acuerdo con este hallazgo al analizar la expresión de *brlA* se observó transcripción de este gen a partir de 24 horas de la inducción del proceso de desarrollo asexual (Materiales y Métodos 2; Fig R3.12C). Esto se interpretó como un primer indicio de que FlbC no estaba ni funcional ni directamente vinculado a FlbB, FlbD y FlbE.

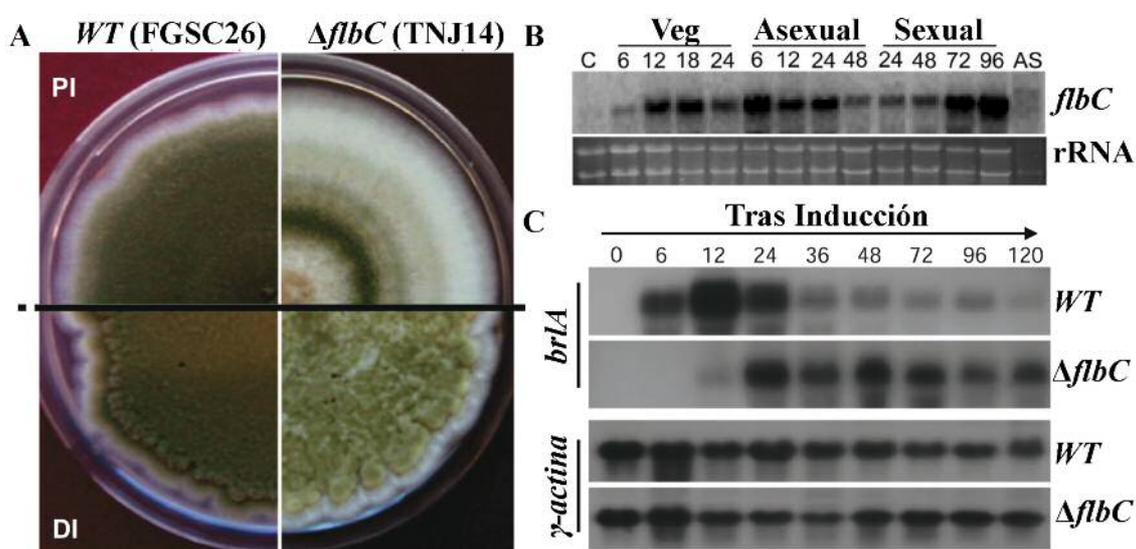


Fig R3.12. Análisis fenotípico y de expresión de *flbC*.

A) Fenotipo de las cepas silvestre (*WT*; FGSC26) y Δ *flbC* cultivadas durante 5 días en MMA. El panel de arriba muestra los fenotipos de colonias tras inoculación central (PI; point inoculation) y el panel tras inoculación en césped (DI; developmental induction).

B) Expresión de *flbC* durante el ciclo de vida de una cepa silvestre en fondo genético VeA+. Los números indican las horas de incubación en medio líquido más glucosa, correspondiente a crecimiento vegetativo (Veg) o bajo condiciones de inducción de desarrollo Asexual o Sexual (ver Materiales y Métodos). Conidias (esporas asexuales) y ascosporas (esporas sexuales) se muestran como C y AS, respectivamente.

C) Northern blot análisis de *brlA* en una cepa silvestre y una cepa Δ *flbC* durante el desarrollo asexual. Los números indican las horas transcurridas tras la inducción de la conidiación. El gen γ -actina (Fidel *et al.*, 1988) fue utilizado como control de carga.

Siguiendo con la caracterización de *flbC*, se estudió su expresión mediante Northern blot durante el ciclo de vida *A. nidulans*, observando que el ARN mensajero de *flbC* estaba presente en todos los estadios excepto en esporas asexuales (conidias) o sexuales (ascoesporas) (Fig R3.12B). Como se pudo observar en los estudios realizados por microscopía sobre la localización de FlbC durante el desarrollo (Fig R1.3; Pag 66), FlbC::GFP se detectó en los núcleos durante todo el proceso de formación del conidióforo excepto en las conidias. De esta manera se demostró que los datos de fluorescencia correspondían con los obtenidos en el análisis de expresión.

Teniendo en cuenta que FlbC es un factor de transcripción que podría ejercer un papel en el desarrollo, se estudió la repercusión que podría tener su expresión en la regulación de *brlA*. Se generó una cepa que expresaba *flbC* bajo el promotor inducible *alcA(p)* (*alcA::flbC*) y el análisis transcripcional mediante Northern blot reveló que la sobreexpresión de *flbC* inducía la activación del gen maestro *brlA*, al igual que la del regulador de la ruta central *abaA*. En cambio, no afectó a la expresión de otro de los miembros de la ruta central como *wetA* (Fig R3.13A).

Al mismo tiempo, el estudio del fenotipo de esa misma cepa de sobreexpresión mostró que, en medio sólido, tanto el crecimiento colonial como la conidiación estaban inhibidos en condiciones inductoras (no mostrado). Al analizar ese fenotipo en detalle, experimentos de microscopía en medio líquido inductor (MMA suplementado con treonina) revelaron la inhibición de crecimiento polar, el aumento de vacuolación y sobre todo el ensanchamiento de las puntas de las hifas, formando estructuras parecidas a vesículas (Fig R3.13B).

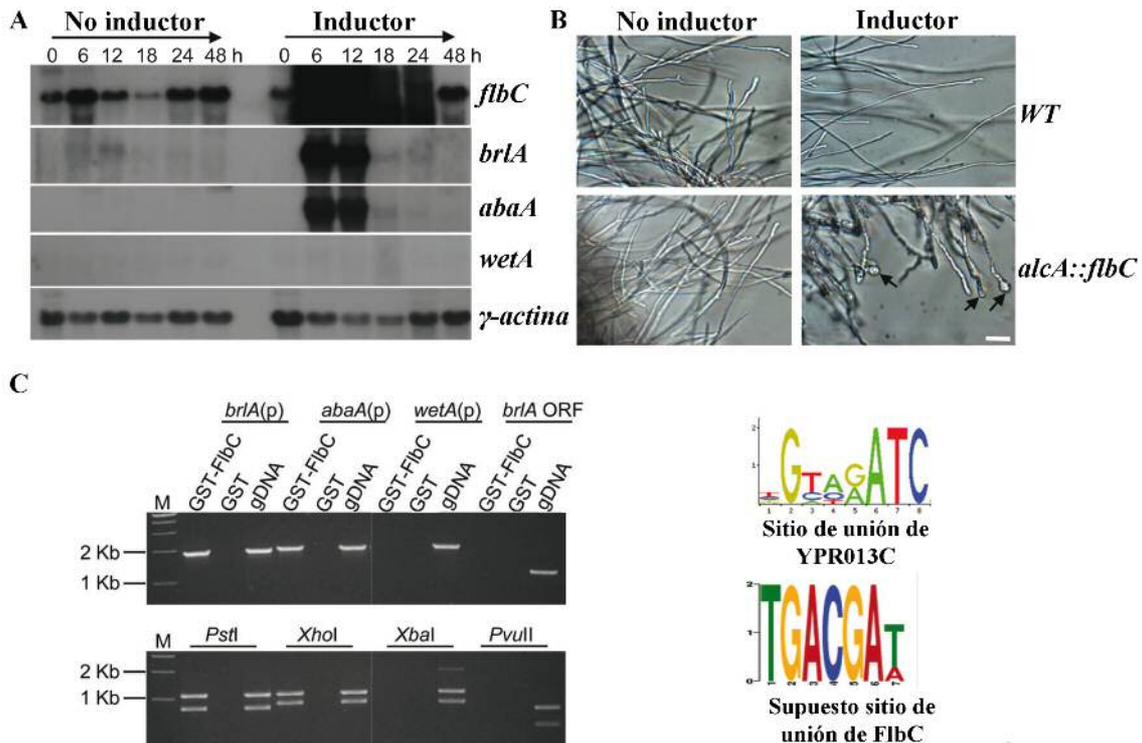


Fig R3.13. A) Análisis de Northern blot de una cepa de sobreexpresión de *flbC*. Los números indican las horas transcurridas tras la transferencia de un micelio cultivado durante 18 horas en MMA a un medio no inductor (MMA) o inductor (MMT).

B) Caracterización del mutante de sobreexpresión de *flbC*. Fotografías tomadas tras 12 horas desde la transferencia a un medio no inductor (MMA) o inductor (MMT). Barra de escala = 20 μ m

C) Ensayo de *pull-down* proteína-ADN *in vitro* para la interacción física entre FlbC y las regiones promotoras de *brlA β* , *abaA* y *wetA*, y una región dentro del marco de lectura (ORF) de *brlA*. GST sola y la región dentro del marco de lectura de *brlA* fueron utilizadas como controles negativos y el ADN genómico (gDNA) fue utilizado como control positivo para la amplificación por PCR de cada región. Los productos de PCR se representan en un gel de agarosa: 1868 pb para *brlA β* , 1926 pb para *abaA*, , 1918 pb para *wetA* y 1160 pb para el ORF de *brlA*. Estos fragmentos fueron posteriormente digeridos mediante enzimas de restricción para verificar cada uno de los fragmentos: 1085, 746 y 37 pb (esta banda no se muestra) para *brlA β* (p); 1085 y 841 pb para *abaA*(p); 1101 y 817 pb para *wetA*(p), y 722, 398 y 40 pb (esta banda no se muestra) para ORF de *brlA*. Los diagramas muestran las secuencias d unión de ADN predichas para FlbC y YPR013C de *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos en los experimentos de sobreexpresión sugirieron la posibilidad de que FlbC regulara directamente tanto la expresión de *brlA* como la expresión de *abaA*. Con el objeto de verificar esta hipótesis se realizaron ensayos de *pull-down* ADN-proteína *in vitro*. Se generó la proteína de fusión GST::FlbC y se estudió su capacidad de unión *in vitro* a fragmentos de ADN. Tras

incubar la proteína de fusión y un fragmento específico de ADN, se evaluó la unión entre ambas mediante la capacidad de amplificar el fragmento de ADN por técnicas de PCR.

Para verificar nuestra hipótesis se utilizaron fragmentos cebadores específicos de los promotores de *brlAβ* (fragmento de 1961pb de promotor; (Prade & Timberlake, 1993)) y *abaA* (fragmento de 2035 pb; (Mirabito *et al.*, 1989)). También se utilizaron fragmentos del promotor de *wetA* (fragmento de 2012 pb; (Marshall & Timberlake, 1991)) y una región dentro del marco de lectura (ORF) de *brlA* (1172 pb), utilizados ambos como controles negativos, ya que de cumplirse la hipótesis, FlbC no sería capaz de unir ninguno de estos dos fragmentos.

Los resultados de estos ensayos mostraron capacidad de amplificar fragmentos de los promotores *brlAβ* y *abaA* que fueron co-precipitados con la proteína GST::FlbC. En cambio las reacciones de PCR sobre los fragmentos correspondientes al promotor de *wetA* y al ORF de *brlAα* no fueron capaces de amplificar tras precipitar GST::FlbC (Fig R3.13C), demostrando que los fragmentos utilizados como control negativo no co-precipitaron con la proteína de fusión. Estos resultados indicaron que FlbC se puede unir directamente a los promotores de *brlAβ* y *abaA*, pero no al promotor de *wetA* y al ORF de *brlAα*, *in vitro*.

Con el objeto de determinar la secuencia de ADN diana a la que se une FlbC en promotores, se analizaron tanto los promotores de *brlAβ* y *abaA*, como las dianas de unión del factor de transcripción tipo dedos de zinc C₂H₂ YPR013C de *Saccharomyces cerevisiae* (Zhu *et al.*, 2009). Una serie de análisis con el software MEME (http://meme.nbcr.net/meme4-3_0/cgi-bin/meme.cgi) facilitaron una secuencia de ADN candidata que FlbC debería ser capaz de unir (Fig R3.13D), la cual coincide con la diana de unión de la proteína YPR013C. Esta secuencia de ADN (TGACGAT) se encuentra en dos lugares del promotor de *brlAβ* y en un lugar en el promotor de *abaA*. Además, y corroborando los datos obtenidos anteriormente se observó que en la región promotora de *wetA* no se encontraba ninguna secuencia diana.

Puesto que FlbC actuaba sobre *brlA*, y este también era activado por FlbB y FlbD, se analizó la posible dependencia que podría haber entre ellos. Para ello se generaron las cepas que expresaban FlbC::GFP en ausencia de *flbB* y *flbE* (mutantes

nulos), y se observó su localización por microscopía y la cantidad de proteína detectable por Western blot. Los resultados mostraron que la delección de un complejo apical funcional, y por tanto de un FlbD funcional, no alteraron los niveles de expresión ni la localización nuclear de FlbC::GFP (Fig R3.14A).

Además, se realizaron estudio contrarios, en los que se evaluó la estabilidad del complejo apical en ausencia de FlbC. Este estudio reveló que en una cepa nula de *flbC*, tanto FlbB como FlbE se encuentran en la punta, y FlbB también en el núcleo (Fig R3.14B), indicando que la ausencia de FlbC no afecta a la correcta expresión y localización de ambas proteínas. Estos experimentos corroboraron la hipótesis de que FlbC actúa en una ruta paralela de inducción a la de FlbB/E → FlbD.

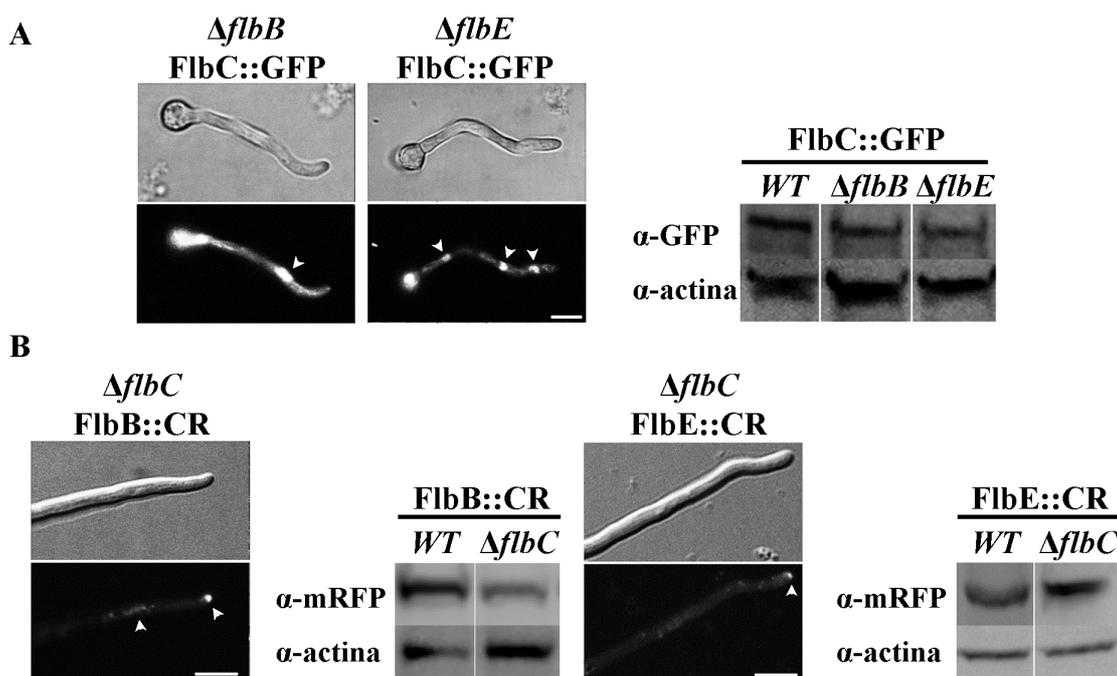


Fig R3.14. Relación proteica entre FlbC y el complejo FlbB/E.

A) Localización y niveles de proteína de FlbC en mutantes nulos de *flbB* y *flbE*. El análisis de Western blot se realizó utilizando anticuerpos primarios anti-GFP o anti-actina. Barra de escala = 10 μ m

B) Localización y niveles de proteína de FlbB y FlbE en mutante nulo de *flbC*. El análisis de Western blot se realizó utilizando anticuerpos primarios anti-mRFP o anti-actina. Barra de escala = 10 μ m

En resumen, se ha demostrado que FlbC es el factor temprano que presenta el mutante con un fenotipo menos extremo (más conidiante), a pesar de ser igualmente necesario para la activación de la ruta central, y en concreto de *brlA*. A su vez, esta activación demostrada *in vitro*, sería completamente independiente de los otros factores FlbB y FlbD.

3. Discusión

En este capítulo se presentan nuevos elementos acerca de la regulación temprana de la conidiación y su repercusión en la activación del gen maestro *brlA*.

Por un lado se presentan nuevas evidencias a favor de uno de los modelos propuestos en el apartado de Introducción de este capítulo, en el cual se postulaba un efecto combinado pero interdependiente de los factores. De esta manera, se observa que la activación de *flbD* es dependiente de FlbB, y a su vez, ambos, FlbB y FlbD, son conjuntamente requeridos para la activación de *brlA* (Fig R3.15). Considerando ese primer punto, se ha demostrado que FlbB activa directamente la expresión de *flbD*. Como FlbB presentó una localización apical y nuclear, es de esperar que sea la forma nuclear la que ejerza ese papel. Aunque, por otro lado, nuestros resultados han mostrado que FlbD se localiza en todos los núcleos de diferentes hifas vegetativas, mientras FlbB se restringe al núcleo más apical. Por lo tanto no podemos descartar que, además de FlbB, otros factores de transcripción pudieran también participar en la regulación de la expresión de *flbD*, algunos de los cuales podrían estar también bajo el control de FlbB.

En este aspecto, se podría considerar que FlbE juega un papel indirecto en la regulación transcripcional de *flbD*. La interacción entre FlbE y FlbB en el complejo apical ha mostrado ser también un requisito para la expresión de *flbD*. Sin embargo, la forma precisa de FlbB que participa en la activación de FlbD queda pendiente de identificar.

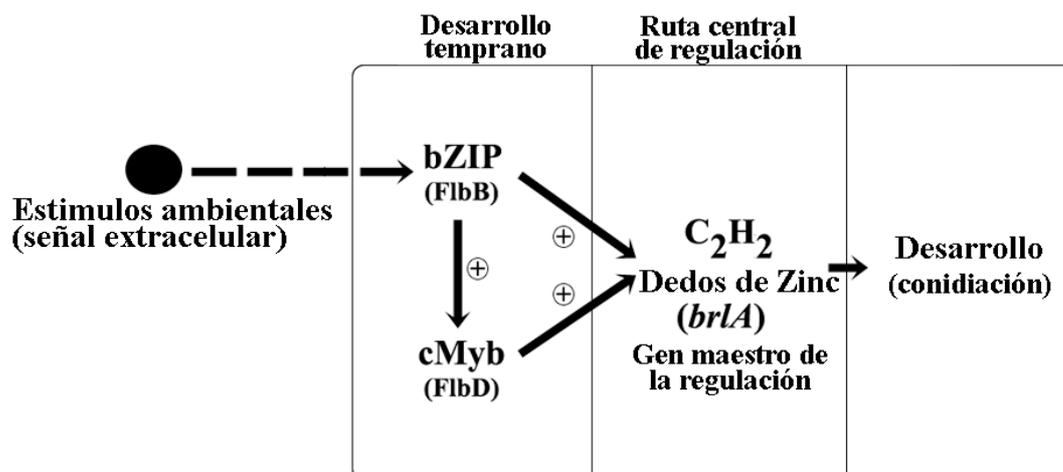


Fig R3.15. Modelo actualizado de la cascada que lleva a la activación del regulador principal *brlA* por los reguladores tempranos FlbB y FlbD.

El segundo elemento de novedad descrito en este trabajo es que FlbB y FlbD conjuntamente promueven la expresión de *brlA*. Esto implicaría, muy probablemente, la existencia de una forma modificada post-transcripcionalmente, y posiblemente activada, de FlbB. Esto fue apoyado por evidencias previas como que la sobreexpresión de *flbB* nativo no activaba la conidiación en medio líquido (Etxebeste *et al.*, 2008), mientras que la sobreexpresión de *flbD* sí que dio lugar a conidiación en esas condiciones en las que el programa de desarrollo asexual no estaba activo (Wieser & Adams, 1995). Esto sugiere que la dosificación de los niveles de FlbD y de una forma de FlbB específicamente activada y presumiblemente transportada desde el *Spitzenkörper* al núcleo, serían requeridas para la formación del complejo transcripcional que ha de inducir la expresión del gen *brlA*.

La activación concertada de *brlA* por FlbD/FlbB es el primer ejemplo de una interacción relevante en el desarrollo de hongos entre factores de transcripción tipo bZip y cMyb. Interacciones similares han sido descritas en eucariotas superiores, incluyendo humanos (Tahirov *et al.*, 2002). También está descrito que los factores de transcripción puedan ejercer varios papeles en el desarrollo, basándose en interacciones con otros factores de transcripción o proteínas (Foster *et al.*, 2009). Una muestra significativa es el doble papel que juega el factor tipo bZip PERIANTHIA en la diferenciación y especificación de órganos florales en *Arabidopsis thaliana*. Este factor de transcripción es activado por WUSCHEL, y ambos factores activan conjuntamente a AGAMOUS (un

factor de transcripción con dominio MADS que juega un papel central en la modulación de la flor). La acumulación de AGAMOUS presumiblemente activa la represión de sus propios activadores (Maier *et al.*, 2009).

Por otro lado, y una vez inducida la conidiación, los niveles de expresión tanto de *flbB* como de *flbD* sufren una disminución tras el máximo que muestran en las primeras etapas del proceso. Esta represión transcripcional coincide con el aumento de niveles de ARN mensajero de *brlA*. La existencia de un efecto de retroalimentación negativo mediado por BrlA fue descartado mediante experimentos de sobreexpresión de este factor transcripcional. Aparentemente, las posibles dianas para este regulador en las regiones promotoras de ambos *UDAs* no deben ser funcionales. No puede excluirse la posibilidad de que existan otros factores involucrados y que medien su acción negativa en este proceso mediante una interacción funcional con BrlA.

Estudios previos realizados de forma separada sobre la expresión de estos tres factores (*flbB*, *flbD* y *brlA*) durante el desarrollo asexual indicaron que FlbB está presente en la transición de métula a fiálida (Etchebest *et al.*, 2009a), mientras el inicio de expresión de BrlA coincide con la formación de vesículas (Adams *et al.*, 1998). Así, la expresión de ambas, FlbB y BrlA, solaparían durante el desarrollo, y hacen más probable que factores expresados aguas debajo de *brlA*, y dependientes de FlbB, pudieran estar involucrados en la represión de los factores *UDA*.

El estudio realizado sobre FlbC también ha aportado nuevos elementos para una mejor comprensión de la ruta del desarrollo asexual. Por un lado los datos obtenidos en este estudio sugirieron que FlbC no sólo participaría en la regulación temprana o inducción de la conidiación, sino que podría tener funciones morfogénicas adicionales como inhibir el crecimiento polar de las hifas. La sobreexpresión de *flbC* en hifas daba lugar a un crecimiento reducido y ensanchamiento de las puntas de las células. Este cambio morfológico en la hifa se asemejaba al que ocurre con las vesículas en el tallo y se observó al mismo tiempo que se producía la activación de la expresión de *brlA*. Sin embargo, en estudios previos ya se había descrito que la sobreexpresión de *brlA* en hifas vegetativas mostraba la producción de conidióforos simples, produciendo conidias directamente desde las puntas de las hifas sin la necesidad de formación de ninguna estructura especializada (Adams *et al.*, 1988). Por tanto, si la inducción de gran cantidad de transcrito de *brlA* mediada por la sobreexpresión de *flbC* no es suficiente para

provocar la conidiación, se sugiere que probablemente la sobreexpresión de *flbC* pueda afectar a más rutas o genes que se activarían durante el desarrollo. Esta teoría concuerda con la presencia de FlbC durante todo el desarrollo.

A pesar de considerar la posibilidad de ejercer funciones adicionales, el ya mencionado alto nivel de transcrito de *brlA* en una cepa de sobreexpresión de *flbC* sugería que FlbC también podría participar directamente en la activación del gen maestro. Esta posibilidad la apoyaban el retraso que sufría la expresión de *brlA* en un nulo de *flbC* y el hecho de que FlbC fuese un factor de transcripción que presentaba dos dominios de dedos de zinc. Tras demostrar por un lado que FlbB y FlbD activaban conjuntamente la expresión de *brlA*, los experimentos de unión proteína-ADN *in vitro* realizados con FlbC apoyaron dicha posibilidad, aportando datos sobre la unión de la proteína FlbC a fragmentos de ADN correspondientes a los promotores de *brlA* y *abaA*. Conjuntamente nuestros datos apoyan la posibilidad de que haya un efecto combinado de tres factores de transcripción, FlbC y FlbB/D, en la región del promotor de *brlA*, modulando entre los tres la expresión del gen maestro de la conidiación.

Sin embargo, tras analizar los resultados de los experimentos de expresión y localización, se observó que la acción que ejercía FlbC era independiente respecto a los otros factores tempranos, ya que ni la localización ni la cantidad de proteína FlbC expresada se vieron alteradas en ausencia del complejo apical FlbB/E y viceversa. En resumen, los tres factores de transcripción conocidos dentro de los denominados UDAs participarían en la activación del gen *brlA* y los tres serían necesarios, pudiendo sugerir que cada ruta de activación sea responsable de activarlo en respuesta a condiciones o señalizaciones específicas de conidicación.

A pesar de haber descrito parte del mecanismo de activación, un completo entendimiento de la regulación de *brlA* puede resultar realmente complicado. Sugerimos que la conidiación es la respuesta a estados medioambientales que señalizan las condiciones adecuadas para que ocurra el desarrollo. Por tanto, hipotetizamos que otros factores específicos de la conidiación de *A. nidulans* tienen que estar presentes en la activación de la expresión de *brlA*, independientemente de los factores Flb, como los que generan la supresión parcial del fenotipo aconidial de los mutantes *flb* bajo condiciones de estrés. Esto podría ocurrir, por ejemplo, por RgsA, una proteína RGS que controla la conidiación bajo condiciones de carbono alteradas o estrés nutricional en

una ruta paralela en la que participa FlbA (Han *et al.*, 2004), o por proteínas reguladoras que podrían ser transportadas dentro o fuera del núcleo por el transportador nuclear KapI (Etxebeste *et al.*, 2009b), cuyo mutante presenta un fenotipo aconidial.

DISCUSIÓN GENERAL

El desarrollo asexual en hongos ha llegado a ser uno de los procesos morfogénicos más estudiados en organismos eucariotas (Fischer & Kües, 2006). Si bien en los años 70 se desarrolló una descripción morfológica y fisiológica de las transformaciones celulares (Smith & Berry, 1974), y en los 80-90 se identificaron, a nivel genético y molecular, varios de los factores que ejercen un papel fundamental en la regulación del proceso (Mims *et al.*, 1988, Adams *et al.*, 1998), la manera en que estos factores regulan la morfogénesis a nivel molecular es todavía una incógnita.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de la regulación temprana del desarrollo asexual y aporta información relevante acerca de las interrelaciones entre factores Flb involucrados. Los resultados obtenidos permiten postular una interpretación novedosa sobre el funcionamiento y la organización de la maquinaria, factores y señales implicados en el proceso de la conidiación. Estas primeras hipótesis serán desarrolladas en esta discusión general como propuestas para futuros estudios.

1. Los metabolitos como señales clave para la conidiación

Existe un consenso general en torno a la entidad y organización de las diferentes etapas y factores que participan en la inducción de la conidiación. El modelo general de este proceso de desarrollo está avalado en la gran mayoría de trabajos publicados (Adams *et al.*, 1998, Fischer & Kües, 2006, Etxebeste *et al.*, 2010). La esporulación se entiende como un proceso morfogénico coordinado que se induce en respuesta a cambios ambientales específicos (Ni *et al.*, 2010). Esta respuesta implica a nivel celular la inhibición del crecimiento vegetativo, la producción de una batería de metabolitos de carácter endógeno denominados autoreguladores y el desarrollo del conidióforo como estructura esporogénica (Fischer & Kües, 2006).

En torno a la producción de metabolitos, Roncal y colaboradores (2002) demostraron que las hifas vegetativas de *Penicillium cyclopium* producen una molécula difusible cuya acumulación en el medio induce el proceso de la esporulación (Roncal *et al.*, 2002). Un metabolito funcionalmente comparable, cuya síntesis requiere de una forma funcional del gen FluG, es necesario para la inducción del proceso en *Aspergillus nidulans* (Lee & Adams, 1994). Sin embargo, esta señal no es la única que actúa en el proceso, ya que se ha identificado una segunda molécula endógena para cuya síntesis

son necesarias formas funcionales de todos los factores *UDA* (FlbA-E) (Lee & Adams, 1996). La observación de que los mutantes de pérdida de función en los genes *UDA* son capaces de producir conidióforos cuando se encuentran en contacto con la señal o con una cepa que la produce (Adams *et al.*, 1998, Etxebeste *et al.*, 2008, Garzia *et al.*, 2009) y, a su vez, de revertir el fenotipo aconidial de un mutante *fluG*, indica la existencia de al menos dos señales y sugiere que éstas actúan de manera concatenada. Hay que destacar que ninguno de los *UDAs* es una proteína con actividad enzimática, mientras que sí se han encontrado proteínas señalizadoras como factores de transcripción (FlbB, FlbC y FlbD), reguladores de proteínas G (FlbA) o con una supuesta función de anclaje (FlbE). Por lo tanto, las rutas responsables de la síntesis del (los) metabolito(s) continúan siendo desconocidas e incluso se carece de datos que determinen si dichas rutas biosintéticas son específicas del proceso de desarrollo asexual. Sin embargo, los resultados obtenidos durante la elaboración de esta tesis sugieren que las posibles rutas genéticas en las que participan los *UDAs* convergen en una única señal y que esa señal es determinante para el inicio del proceso. Al mismo tiempo, el hecho de que mutantes en los *UDA* sean capaces de generar conidióforos completos en las condiciones previamente descritas sugiere que los *flbs* y, en consecuencia, los autoreguladores ligados a su actividad, regulan la inducción de la conidiación pero no la génesis de los tipos celulares que conforman el conidióforo.

Por tanto, mientras que la acumulación en la superficie de las hifas del metabolito ligado a la actividad FluG daría cuenta de la emergencia al medio aéreo (Lee & Adams, 1996), los estudios realizados sobre el segundo metabolito ligado a la actividad *UDA* no muestran evidencias que indiquen que la función que pueda ejercer no esté también ligada al mismo estímulo. Una pregunta que se puede plantear en torno a este aspecto es ¿cuál sería la necesidad de dos señales solubles diferentes para un correcto desarrollo del proceso? Hay que destacar que la producción de conidióforos en un micelio da muestras de ser un proceso altamente organizado. Durante la fase de crecimiento vegetativo micelial todas las hifas adoptan un patrón de desarrollo celular similar, extendiéndose mediante crecimiento polarizado. Sin embargo, en condiciones de inducción, no todas las hifas se diferencian y los conidióforos se producen únicamente a partir de las células especializadas, denominadas células pie, que surgen de un número discreto de hifas. Los conidióforos aparecen distribuidos de manera regular sobre la superficie de la colonia y la mayoría de ellos llegan a desarrollarse

plenamente, produciendo alrededor de 60 mótulas, 120 fiálicas y cadenas de alrededor de 10.000 conidios por cada estructura. Esta observación se muestra en las imágenes de la Fig DG1, donde se aprecia la distribución homogénea de conidióforos en la superficie del micelio, mientras que a nivel ultra-microscópico puede verse cómo no todas las células del micelio se diferencian. Es lógico suponer que este sofisticado y reproducible proceso celular debe de precisar de una gestión optimizada de los recursos energéticos de la colonia dado que los conidióforos se generan en las zonas de la colonia de mayor edad y/o donde el sustrato contiene menor cantidad de nutrientes. Aparentemente el material y la energía necesaria para producir las diferentes formas celulares del conidióforo es suministrado a través de los procesos de autólisis en células colindantes (Emri *et al.*, 2008). Las células vegetativas que permanecen vivas tendrían como misión el transporte de dichos nutrientes hacia el conidióforo asemejando a un sistema radicular. Queda implícita la necesidad de un sistema regulador que permita determinar qué células se comprometen con el desarrollo asexual frente a aquellas que cumplan un papel de soporte. Se puede postular, por tanto, la conveniencia de una señal difusible para diferenciar unas células de otras, regulando de esta manera la cantidad de conidióforos a los que el micelio sea capaz de abastecer. Una posibilidad sería que el segundo metabolito dependiente de los UDAs pudiera participar en establecer este orden. Esta hipótesis se ve reforzada con la reciente demostración de la dependencia de la autólisis en *Aspergillus nidulans* con respecto a FluG y diferentes factores de la ruta UDA (FlbB-D; (Emri *et al.*, 2008)).

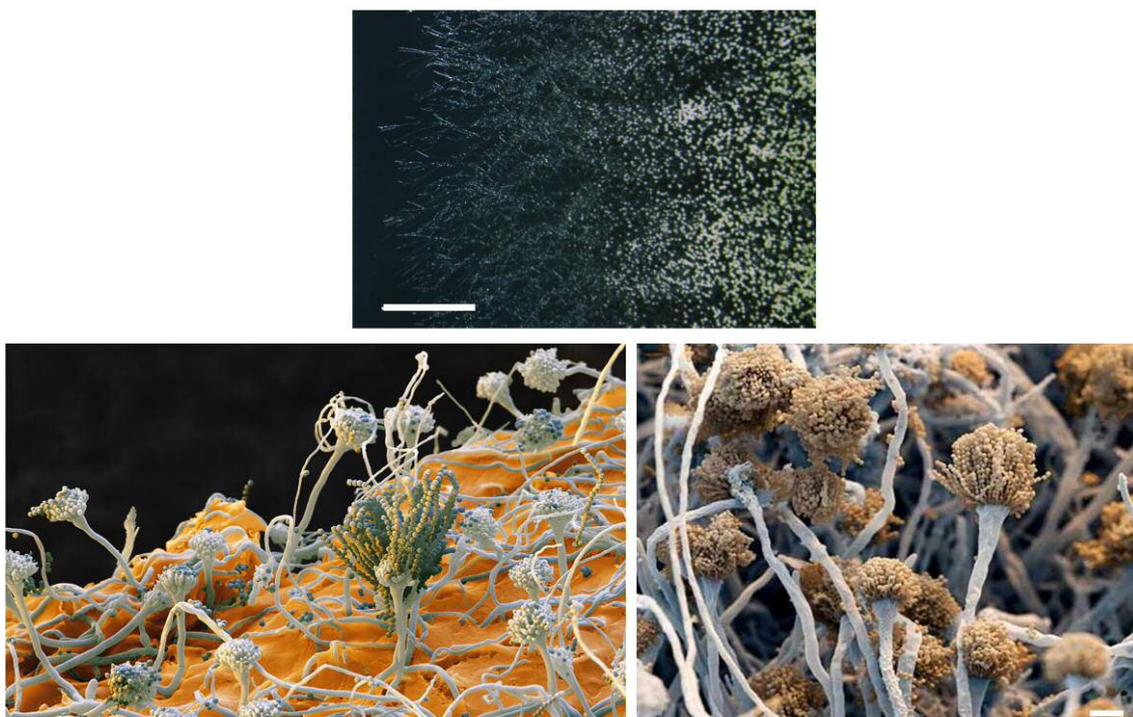


Fig DG1. Fotografías representativas del proceso organizado que es la formación del conidióforo. A) Visión de un micelio en condiciones de esporulación. Se puede observar que los conidióforos se generan de manera regular a lo largo del micelio (Rodríguez-Urra *et al.*, 2009). Barra de escala = 1mm B) y C) Imágenes de microscopio electrónico en el que se muestran conidióforos e hifas colindantes que no sufren ningún tipo de diferenciación (cortesía de BASF). Barra de escala = 10 μ m.

La identificación de la composición y estructura de estas moléculas señalizadoras y la posible dependencia entre ambas, pudiendo ser la segunda derivada de la primera, aportará datos para una mejor comprensión del sistema regulador. Al nivel en que se encuentra el conocimiento de este proceso no se puede descartar que existan señales aún no descritas que tengan un efecto negativo y actúen, por lo tanto, causando la inhibición de la formación de conidióforos. En este sentido, han sido identificados cuatro genes cuyas formas mutantes suprimen la pérdida de función de FluG (Seo *et al.*, 2003). Sólo uno de ellos, SfgA, nuevamente un factor transcripcional, ha sido caracterizado como un represor de la actividad de los factores Flb (Seo *et al.*, 2006). No podemos descartar que éste u otros factores participen en la síntesis de un autoregulador que inhibiría la conidiación.

Aceptar la interdependencia entre los lenguajes químicos y los procesos genéticos de desarrollo en hongos ha renovado el interés de diferentes grupos hacia las moléculas de señalización, las cuales se pueden ahora estudiar utilizando técnicas tanto bioquímicas como moleculares actualizadas (Leeder *et al.*, 2011). Abordajes experimentales basados en técnicas de genética en reverso permitirían caracterizar a proteínas que predeciblemente, a través del análisis de su estructura primaria, pudieran estar implicados en la producción de señales. Estudios de secuenciación masiva, donde se analizarían patrones de expresión en condiciones de inducción, también podrían permitir identificar genes candidatos que participarían tanto en el proceso de generar las señales como en procesar su recepción. Recientemente, en torno a esta visión, se ha llevado a cabo un análisis sistemático de mutantes nulos de 32 policétido sintetasas de *A. nidulans* (Nielsen *et al.*, 2011), ya que los policétidos constituyen la mayor parte de metabolitos que produce el hongo. En ese trabajo se ha demostrado la viabilidad y capacidad conidiante de todos los mutantes nulos, indicando que ninguno de los 32 genes es esencial para el crecimiento y que ninguno de los productos derivados de estos genes es necesario para la conidiación. El hecho de que ninguno de los mutantes muestre un fenotipo distinguible podría sugerir una redundancia funcional de estas proteínas, la cual tendría que ser verificado con el análisis de patrones de metabolitos producidos por cada mutante mediante técnicas de extracciones bioquímicas.

2. El modo de acción de los UDAs en la regulación temprana de la conidiación

Además de su papel en la biosíntesis de metabolitos inductores de carácter endógeno, los factores *UDA* ejercen un papel central en el control espacio-temporal de la expresión del gen maestro de la ruta central, *brlA*. El trabajo realizado durante esta tesis revela aspectos de la mecánica de la señalización y regulación desconocidos hasta ahora en torno al funcionamiento de estos factores sobre la inducción del gen maestro *brlA*, que desencadena en el desarrollo completo del conidioforo.

La dinámica de la localización y las interacciones de FlbB como factor regulador de la conidiación ilustra la versatilidad que puede exhibir uno de estos factores dentro del sistema. FlbB es un factor de transcripción que se encuentra en dos localizaciones

distintas. Su localización apical en o próxima al *Spitzenkörper* en hifas vegetativas, formando un complejo con FlbE (Fig DG2; (Garzia *et al.*, 2009)), sugiere un papel sensorial sobre las condiciones en el punto de extensión celular. Aunque se desconoce la manera en la que se coordina esta maquinaria de inducción con aquella que controla el crecimiento polar, la presencia de este sensor podría ser consecuencia de que la punta es la responsable de explorar nuevos medios, y por lo tanto, la primera que detecta cambios en las condiciones ambientales. Hay que destacar que estudios de citología (Harris *et al.*, 2005) demostraron que el citoplasma apical podría estar saturado de materia (vesículas, ribosomas, mitocondrias...), lo cual dificultaría la difusión de cualquier señal dentro de la célula. Por esta razón se propone que una proteína con actividad sensorial de las condiciones ambientales debería localizar en la punta.

Además de su localización apical, FlbB también se acumula en el núcleo más apical de las hifas vegetativas, siendo el primer factor de transcripción conocido en *A. nidulans* con esta localización específica (Etxebeste *et al.*, 2008). Esta localización se mantiene incluso después de la mitosis semiabierta que ocurre en este hongo (De Souza *et al.*, 2004, Etxebeste *et al.*, 2009a). Durante la mitosis, cuando los poros nucleares (NPCs) se desensamblan parcialmente, FlbB se dispersa a lo largo del citoplasma (Etxebeste *et al.*, 2009a). Al final de la mitosis, cuando se reestablece la organización de los NPC (De Souza & Osmani, 2007), FlbB vuelve a acumularse en el núcleo más apical. Esta observación sugiere la propuesta de dos modelos de funcionamiento: en el primero de ellos el núcleo más apical poseería la maquinaria para importar específicamente a dicho factor, mientras que en el segundo la proximidad de la punta daría lugar al llenado preferente del núcleo más apical. El hecho de que toda la maquinaria de transporte nuclear está presente en todos los núcleos del sincitio prácticamente anula la primera posibilidad (Markina-Iñarrairaegui, 2011). La fracción de FlbB importada desde la punta proporcionaría al núcleo información sobre las condiciones ambientales que encuentra la zona de crecimiento. Siguiendo esta misma línea, y tal y como se ha descrito en esta tesis (Fig R2.6, Pag 84), el hecho de que FlbB se deslocalice tanto de la punta como del núcleo en un mutante nulo de *flbE* sugiere una secuencia de acontecimientos donde se precisaría inicialmente la localización de FlbB en la punta, para posteriormente poder ser importada desde allí al núcleo. Los bajos niveles de fluorescencia en una cepa que expresa a FlbB etiquetada con GFP también han dificultado el análisis por técnicas de FRAP de la dinámica entre la punta y núcleo

apical de esta proteína. Con el objeto de profundizar en el funcionamiento de esta proteína, se están realizando en nuestro grupo estudios de posibles dominios funcionales FlbB mediante mutagénesis de residuos puntuales, analizando así su funcionalidad. A nivel molecular, resultados preliminares obtenidos sugieren que determinadas formas mutantes que muestran acumulación únicamente nuclear, sin necesidad de una fracción de FlbB apical, son incapaces de inducir la conidiación, lo cual indicaría que el paso de FlbB por la punta es necesario para que su papel inductor se lleve a cabo (Herrero-García, comunicación verbal).

El dinamismo descrito en la localización subcelular de FlbB y su hipotético papel sensor sugieren la existencia de diversas formas modificadas de la proteína. El hecho de que formas etiquetadas de FlbB con GFP tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal no muestren diferencias en localización, movilidad electroforética en geles de SDS-PAGE o fenotipo colonial, indica que FlbB no sufre un proceso de truncamiento durante su tiempo de vida (Etxebeste *et al.*, 2009a, Garzia *et al.*, 2009). Otras modificaciones post-traduccionales cobraron importancia tras observar que la región de unión a ADN del dominio bZip de FlbB, así como la mitad C-terminal (residuos 311-403) presentan un alto grado de similitud con el factor Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe* que regula la respuesta al estrés oxidativo (Glover & Harrison, 1995, Etxebeste *et al.*, 2009a, Cortese *et al.*, 2011). La exposición de la célula al aire y la consiguiente ausencia de glucosa en el ápice podría incrementar la producción en las mitocondrias de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chae *et al.*, 2007), lo cual sugiere que FlbB podría sufrir modificaciones dependientes de ROS, como ocurre en la oxidación/reducción de las cisteínas en Pap1. El homólogo de Pap1 en *Aspergillus nidulans* está identificado como NapA (AN7513.3; (Asano *et al.*, 2007)), pero la similitud en la secuencia primaria de FlbB con esta familia de bZip-s podría indicar la existencia de un ancestro común. FlbB podría haber evolucionado y proporcionado la capacidad al hongo de generar conidióforos (Cortese *et al.*, 2011). Nuestra hipótesis es que las regiones conservadas entre Pap1 y FlbB sugieren que el mecanismo señalizador en el que pudiera participar también fuera similar, adaptando en este caso las respuestas a las señales específicas relacionadas con la conidiación. El hecho de que el dominio de unión a ADN de FlbB sea capaz de unir dianas descritas para Pap1 refuerza la idea de un mecanismo funcional conservado. En torno a esta hipótesis, estudios bioinformáticos realizados recientemente han identificado en la

estructura primaria de FlbB residuos de cisteína que podrían ser candidatos potenciales a estar involucrados en esa recepción de señales y la consiguiente modificación post-traducciona (Cortese *et al.*, 2011). El fenotipo aconidial causado por la sustitución puntual de la cisteína 382 de FlbB por una alanina demuestra que este residuo es necesario para una correcta funcionalidad de FlbB (Herrero-García, comunicación verbal). El análisis de otros residuos y dominios conservados potencialmente funcionales (Cortese *et al.*, 2011) aportarán nuevos datos sobre las formas de FlbB que actúan en condiciones vegetativas o inductoras y sobre el mecanismo de señalización.

En consonancia con lo que se ha expuesto hasta ahora, se podría hipotetizar sobre la existencia de una primera forma de FlbB transportada al núcleo más apical mientras haya condiciones de crecimiento vegetativo (crecimiento sumergido, abundancia de nutrientes), cuya función sería la activación transcripcional del FlbD (Fig DG2; (Garzia *et al.*, 2010)). Sin embargo, bajo condiciones inductoras de conidiación, una forma modificada de FlbB sería transportada para ejercer la función de activar la expresión de *brlA* junto con FlbD (Fig DG2; (Garzia *et al.*, 2010)). En estas condiciones FlbB se acumula en todos los núcleos y por lo tanto es posible que en todos esos núcleos sea donde interaccione con FlbD.

En las primeras etapas de inducción FlbB y FlbD deberían activar coordinadamente la expresión de *brlA*. Para que todo esto pueda ocurrir es lógico pensar que sería necesaria una mayor cantidad de ambos factores, lo cual facilitaría la posible interacción entre ambas y aumentaría la capacidad de activar *brlA*. Esto es coherente con la mayor acumulación del ARN mensajero de ambos factores a las 6 horas tras la inducción, momento en el que se activa *brlA* (Fig R2.9 y R3.2). Sin embargo, en ausencia de FlbD no se pudo observar ningún incremento en los niveles de expresión de *flbB* durante las primeras fases de desarrollo asexual (Fig R3.3). Por ello, se podría considerar que este incremento del nivel de transcrito de *flbB* es dependiente de FlbD, cuya expresión a su vez es dependiente de FlbB. Esto hace plantear la posibilidad de que exista un mecanismo de retroalimentación entre ambas proteínas, formando un bucle de activación FlbB \leftrightarrow FlbD, hasta expresar suficiente proteína de ambas como para localizar en todos los núcleos y poder así interaccionar entre sí. Esta regulación cruzada debería ocurrir durante el periodo de inducción de la conidiación y la activación transcripcional de *brlA*, la cual deriva en la formación de vesículas (Fig DG2). Por otro lado, el hecho de que la activación de *brlA* pudiera ser dependiente de una forma

modificada de FlbB hace plantearse la posibilidad de que pueda ser necesaria la modificación de FlbB para que ocurra la supuesta interacción con FlbD.

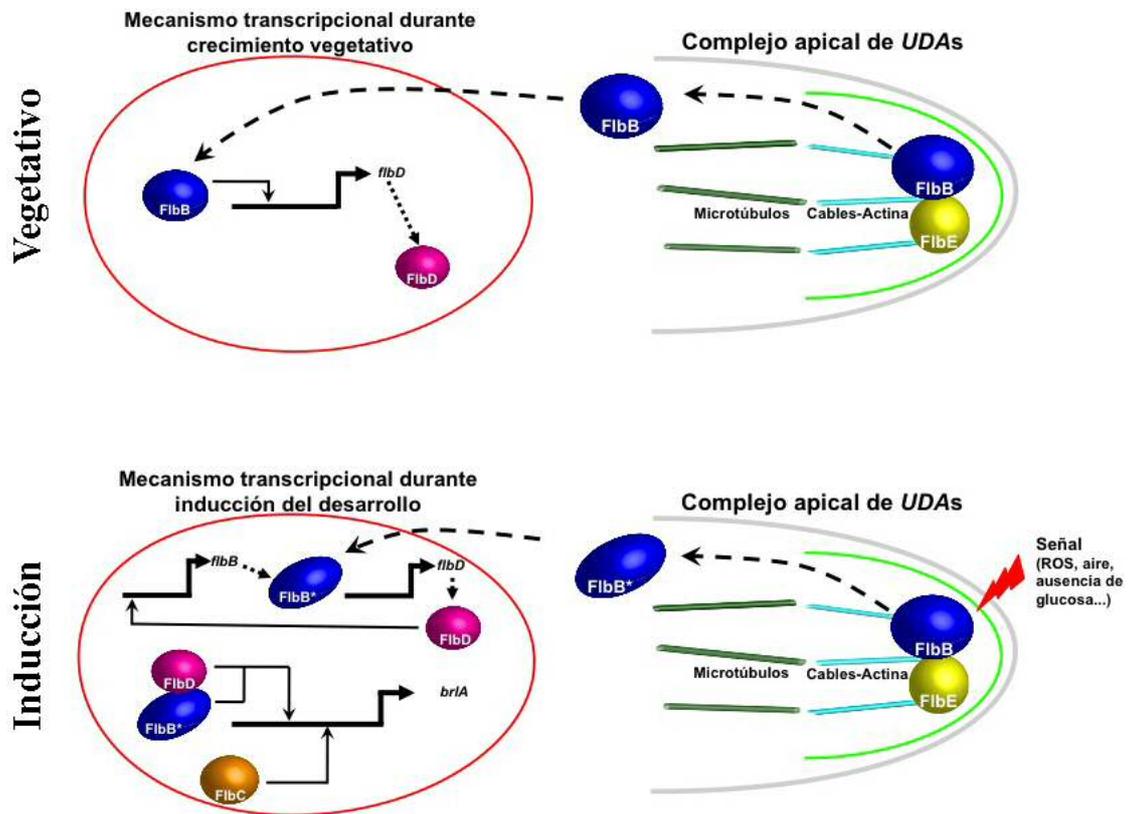


Fig DG2. Interacciones proteína-proteína y modelo de activación de la conidiación por parte de UDAs durante el crecimiento vegetativo e inducción de la conidiación. En este hipotético modelo, el complejo FlbB-FlbE está localizado en la punta de la hifa, en o próximo al *Spitzenkörper* (semicírculo verde) y es dependiente del citoesqueleto de actina (panel derecho). Una fracción de FlbB es transportada al núcleo tras cada mitosis, proporcionando información sobre las condiciones apicales (representado por la línea discontinua desde el panel de la derecha al núcleo del panel de la izquierda). En condiciones de esporulación a una modificación de la forma apical (FlbB*) dependiente de una señal desconocida es importada. En el núcleo, FlbB activa la expresión de *flbD* para posteriormente, en condiciones de inducción, formar un bucle de retroalimentación. FlbB* conjuntamente con FlbD activa la expresión de *brlA* y el desarrollo del conidióforo.

Otro de los factores que participan en el desarrollo de la conidiación y que actúa como promotor de *brlA* es FlbC. Este tercer regulador transcripcional podría también estar involucrado en la activación coordinada de *brlA* conjuntamente con el complejo transcripcional de FlbB y FlbD (Fig DG2), pero esto aún no ha sido investigado en

detalle. Un fenotipo destacable inducido por la sobreexpresión de este factor de transcripción es el cese del crecimiento polarizado y el ensanchamiento del ápice de la hifa. Esto se asemejaría al cese de crecimiento del tallo que da lugar a la formación de la vesícula, que coincide con el momento en el que el gen *flbC* alcanza mayor nivel de expresión (Kwon *et al.*, 2010) y simultáneamente con el inicio de transcripción de *brlA*. Dado que la sobreexpresión o la expresión desregulada de *brlA* no da lugar a este fenotipo (Adams *et al.*, 1988, Adams & Timberlake, 1990), no debemos descartar un papel regulador de FlbC sobre la disposición de la maquinaria de crecimiento polarizado y sugerir a este *UDA* como un elemento clave en la transición hifa/vesícula y en el proceso de transmisión de la señal a *brlA*.

En resumen, los resultados obtenidos en estudios de genéticos muestran que la acción de los *UDAs* converge molecularmente en un mismo punto, *brlA*, como ya se sugería para la biosíntesis del metabolito. La compleja regulación de *brlA* indica que la manera en la que se integran las señales a nivel molecular es a través de la acción combinada y/o cruzada de estos factores de transcripción. Esto justifica nuevos experimentos con el objeto de profundizar aún más en las relaciones entre los *UDAs* y poder así describir el mecanismo global mediante el cual modulan la señalización.

En torno a la coordinación entre los factores reguladores, la aplicación de técnicas de secuenciación masiva podría ser útil en el futuro. El estudio de patrones de expresión diferenciados entre una cepa silvestre y un mutante nulo de uno de los factores transcripcionales podría ser de gran ayuda a la hora de identificar genes potencialmente participes en el desarrollo y regulados por proteínas ya conocidas. La caracterización de estos nuevos genes seguiría aportando conocimientos al sistema y abriría nuevas líneas de investigación. De la misma manera podríamos definir patrones de expresión durante el desarrollo en una cepa silvestre, aportando datos acerca de genes involucrados en la génesis de cada uno de los tipos de células. Esto podría ayudar a asociar el sistema señalizador y el sistema encargado de erigir las estructuras celulares.

3. La conidiación: cadena de subprogramas de desarrollo celular.

La formación de cada uno de los 6 tipos celulares: célula pie, tallo, vesícula, métulas, fiálidas y conidios, que, en conjunto, forman el conidióforo puede considerarse como el resultado de la activación de un subprograma genético específico como se defiende a continuación. Un estudio más detallado de los factores que actúan en cada etapa y como se concatenan debería ser una manera efectiva de avanzar en el conocimiento global del proceso.

En barridos de mutantes realizados durante más de 30 años se han podido identificar mutantes bloqueados en fase vegetativa o afectados en estadios tardíos del proceso. Esto último es lo que ocurre, por ejemplo, en mutantes de *abaA*, en los cuales se forman fiálidas procedentes de otras fiálidas, pero sin llegar a producir esporas (Sewall *et al.*, 1990a); o en mutantes de *wetA*, cuyas esporas carecen de pigmentos, lo que indica falta de maduración, además de estar afectadas en la integridad de la pared celular lo que causa finalmente su lisis (Marshall & Timberlake, 1991). Sin embargo, apenas se han podido obtener mutantes y otros datos genéticos sobre los primeros estadios de la inducción, las cuales comprenden la diferenciación desde hifas vegetativas a células pie o incluso la elongación de los tallos. El estudio de estas etapas cobra especial importancia tras el trabajo realizado en esta tesis, ya que a pesar de obtener datos sobre la regulación del proceso, la formación de estos estadios sigue siendo una incógnita. Hay que destacar que los mutantes en los *UDAs* no son capaces de producir ninguna célula especializada, mientras que los mutantes en el siguiente factor conocido, *brlA*, muestran tallos sin capacidad de generar vesículas, no siendo conocido ningún factor involucrado en las primeras fases del desarrollo. Aquí se demuestra que FlbB, FlbD y FlbC actúan directamente sobre el promotor de *brlA*, por lo tanto, de existir otros factores, éstos también actuarían directamente sobre *brlA*, añadiendo nuevas formas de modulación de la expresión de este gen, o modulando la actividad de los anteriores factores Flb. Esto suscita el planteamiento de la hipótesis de que *Aspergillus nidulans* no dispone de factores específicos para la génesis de cada tipo de célula y se sugiere que podría haber factores que regulan el proceso, pero que los mecanismos responsables podrían tratarse de variantes de mecanismos existentes desde etapas de crecimiento vegetativo. Por ejemplo, la extensión de tallos y la formación de métulas y fiálidas podrían considerarse pseudohifas o procesos de germinación multipolares, y probablemente sean resultado de una regulación programada por una

maquinaria celular que adoptaría una configuración diferente de la que tendría durante el crecimiento vegetativo, ya que no hay razones para sugerir que exista una maquinaria específica.

Los nuevos conceptos descritos en esta tesis, apoyan la idea de cómo un factor podría desempeñar diferentes funciones dependiendo de cambios específicos en su localización celular combinado con la formación de diferentes complejos proteína-proteína. En este sentido la multiplicidad funcional de FlbB (sensor apical, activador de *flbD* y co-activador de *brlA*) representa un ejemplo ilustrativo. A esto habría que añadir que FlbB localiza en las mótulas incipientes que emergen desde las vesículas (Etxebeste *et al.*, 2009a), sugiriendo funciones adicionales una vez iniciada la producción del conidiación. De la misma manera, trabajos recientes presentados por Bayram y colaboradores (2010) sobre el regulador de la respuesta a la exposición a la luz VeA han sugerido esta misma visión de multiplicidad funcional (ver Introducción general; (Bayram *et al.*, 2010)). La capacidad de este factor para cambiar su localización celular dependiendo de las condiciones ambientales y para formar diversos complejos proteicos (Calvo, 2008), como por ejemplo, con receptores de luz roja (FhpA) o azul (LreA y LreB) (Purschwitz *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2009) o con factores que regulan el metabolismo secundario (LaeA y VelB; (Bok & Keller, 2004, Bayram *et al.*, 2008)) dan muestra de su versatilidad. En este aspecto, la Fig DG3 muestra los patrones de expresión o síntesis de proteína de diversos reguladores del desarrollo, y sugiere que la mayoría de ellos podría desempeñar funciones específicas en más de una etapa. Estudios futuros utilizando técnicas de localización e interacción entre proteínas *in vivo*, combinados con análisis de expresión detallados se podrían identificar más casos como los presentados a lo largo de esta tesis.

En resumen, la hipótesis propuesta en base a estos últimos trabajos podría explicar cómo un proceso de múltiples etapas puede ser regulado con un número relativamente limitado de factores dependiendo de su localización o disponibilidad de interactores. El hecho de que haya factores que puedan participar en más de una etapa durante el desarrollo abre la posibilidad de realizar experimentos más avanzados en este aspecto. El enfoque que se ha planteado tradicionalmente, basado en la caracterización de mutantes de pérdida de función o nulos, ha generado avances significativos, pero presenta serias dificultades técnicas, ya que limitaría el análisis de la acción de cualquier proteína a su primera función. Por ello habría que plantearse nuevos métodos

de identificación de mutantes que aportaran datos sobre funciones en etapas específicas del proceso.

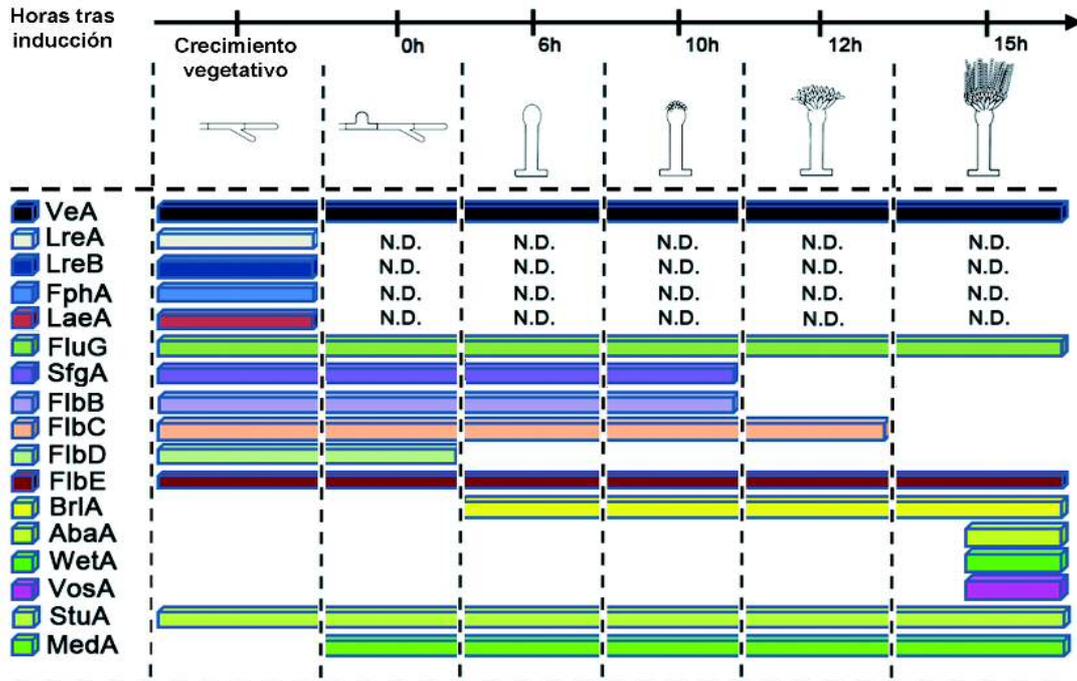


Fig DG3. Esquema que representa el solapamiento de factores a lo largo del desarrollo del conidióforo. El diagrama muestra los intervalos de tiempo en los que los reguladores del desarrollo han sido detectados. Las barras indican la detección cualitativa de cada factor mediante Northern blot y/o microscopía de fluorescencia. N.D. indica que la expresión o la fluorescencia no ha sido determinada.

Una de las posibilidades de abordar nuevos estudios sería realizar experimentos de silenciamiento génico específico para cada gen y etapa, de forma similar a la expuesta por Barton, L. M. y R. A. Prade, (2008) con *brlAβ*. En este trabajo la construcción de ARN interferente que utilizaron constaba de dos repeticiones invertidas del promotor inducible *alcA* flanqueando a *brlAβ* (Fig DG4). De esta manera, bajo condiciones inductoras el ARN de doble hebra era transcrito accionando el mecanismo de ARNi para silenciar *brlAβ*. Este método podría ser de gran utilidad para obtener datos sobre las funciones que pueda ejercer cada factor en diferentes etapas del proceso. El objetivo sería silenciar cada uno de los factores en diferentes etapas del desarrollo y observar los cambios fenotípicos que puedan aparecer. Opcionalmente, en esta cascada

de señalización/regulación transcripcional, se podrían utilizar promotores de factores expresados aguas abajo del gen que se pretende analizar en lugar del promotor inducible *alcA*. De esta manera, el silenciamiento de un determinado factor sería dependiente de la activación de otro. Por ejemplo, se podría silenciar la expresión de *flbB* bajo el promotor de *brlA*, de tal manera que la activación de *brlA* en la etapa de formación de vesículas bloquearía la expresión de *flbB*, no pudiendo localizar FlbB en mótulas. Esto podría aportarnos evidencia sobre la posible función que ejerce FlbB en ese tipo de células.



Fig DG4. A) La construcción de ARNi consiste en repeticiones invertidas del promotor inducible *alcA* flanqueando a *brlAβ* (Barton & Prade, 2008). B) Posible diseño para el análisis de FlbB en mótulas. Silenciamiento de *flbB* dependiente del promotor de *brlA*.

Otra de las aproximaciones experimentales sería la búsqueda de mutantes termosensibles, de forma que se pudiera obtener una pérdida de función de la proteína mutante a una temperatura concreta. Por ejemplo, cabría la posibilidad de obtener mediante PCR mutantes termosensibles de posibles dominios funcionales de FlbB identificados mediante métodos bioinformáticos (Cortese *et al.*, 2011). El estudio fenotípico a diferentes temperaturas podría aportar datos sobre las diferentes funciones que pueda ejercer en diferentes estadios del desarrollo.

Al inicio de esta tesis se partía desde una visión o modelo regulatorio lineal del proceso de inducción de la conidiación, donde los factores involucrados en el desarrollo ejercían su función en una cascada consecutiva de proteínas Flb o desde rutas independientes, desembocando en la ruta central de la conidiación. Actualmente se considera un modelo en el que los diferentes factores Flb modulan entre sí su expresión,

localización celular y/o actividad, para finalmente dar lugar a la regulación directa de la expresión del gen maestro *brlA*. Se describe la complejidad de la señal metabólica implicada, pero se desconoce el nexo entre los elementos genéticos y los metabolitos, cómo se modulan mutuamente y cómo se gestiona la señalización al estímulo que da lugar al desarrollo asexual. Los datos obtenidos actualizan el modelo pero no responden a todas las incógnitas, lo que reactiva enormemente el campo de investigación entorno a este proceso de desarrollo morfológico específico de hongos filamentosos pero con elementos comunes de otros procesos morfogenéticos en organismos más complejos.

CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado el producto del gen AN0721.3 que corresponde al factor que media en la regulación de la expresión de *brlA*, FlbE.
2. De entre los factores Flb conocidos, sólo FlbB y FlbE se localizan en la punta de la hifa formando lo que se ha denominado el complejo apical. FlbA muestra una localización a lo largo de toda la hifa, mientras que FlbC y FlbD, de acuerdo con su posible función como factores transcripcionales, se acumulan en los núcleos de la célula.
3. La localización apical del factor de inducción temprana FlbB depende de su interacción con el factor FlbE en la punta de las hifas vegetativas. Esta localización indica una posible función sensorial y posterior transporte de la proteína FlbB señalizada preferentemente al núcleo más apical.
4. FlbB activa la expresión de *flbD* uniéndose en su promotor a secuencias diana típicas de factores de transcripción del tipo bZip.
5. FlbB y FlbD inducen coordinadamente la expresión del primer gen de la ruta central de conidiación *brlA*, uniéndose directamente en el promotor a secuencias diana del tipo bZip y cMyb.
6. FlbC también participa en la activación de la expresión de *brlA* uniéndose al promotor, pero a través de una ruta de señalización independiente a la anterior.
7. Los resultados obtenidos ponen de relieve el papel multifuncional de algunos factores de regulación dependiendo de su localización y perfil de interacción con otros factores en cada etapa del desarrollo.
8. El modelo de estudio entre factores de regulación del desarrollo en *Aspergillus nidulans* ofrece ventajas interesantes para el estudio avanzado de esta materia, así como sus puntos comunes con eucariotas superiores.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T. H., M. T. Boylan & W. E. Timberlake, (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362.
- Adams, T. H. & W. E. Timberlake, (1990) Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 5405-5409.
- Adams, T. H., J. K. Wieser & J. H. Yu, (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 35-54.
- Aguirre, J., (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Molecular Microbiology* **8**: 211-218.
- Andrianopoulos, A. & W. E. Timberlake, (1991) ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *The Plant cell* **3**: 747-748.
- Andrianopoulos, A. & W. E. Timberlake, (1994) The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 2503-2515.
- Araújo-Bazán, L., S. Dhingra, J. Chu, J. Fernández-Martínez, A. M. Calvo & E. A. Espeso, (2009) Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 506-515.
- Aronov, S., R. Gelin-Licht, G. Zipor, L. Haim, E. Safran & J. E. Gerst, (2007) mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 3441-3455.
- Asano, Y., D. Hagiwara, T. Yamashino & T. Mizuno, (2007) Characterization of the bZip-Type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 1800-1803.

- Atoui, A., C. Kastner, C. M. Larey, R. Thokala, O. Etxebeste, E. A. Espeso, R. Fischer & A. M. Calvo, (2010) Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 962-972.
- Azuma, N., K. Kanamaru, A. Matsushika, T. Yamashino, T. Mizuno, M. Kato & T. Kobayashi, (2007) *In vitro* analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: The first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 2493-2502.
- Bartnicki-Garcia, S., D. D. Bartnicki, G. Gierz, R. Lopez-Franco & C. E. Bracker, (1995) Evidence that *Spitzenkörper* behavior determines the shape of a fungal hypha: A test of the hyphoid model. *Experimental Mycology* **19**: 153-159.
- Barton, L. M. & R. A. Prade, (2008) Inducible RNA interference of *brlA beta* in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7**: 2004-2007.
- Bayram, O., G. H. Braus, R. Fischer & J. Rodriguez-Romero, (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 900-908.
- Bayram, O., S. Krappmann, M. Ni, W. B. Jin, K. Helmstaedt, O. Valerius, S. Braus-Stromeyer, N. J. Kwon, N. P. Keller, J. H. Yu & G. H. Braus, (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**: 1504-1506.
- Becht, P., J. König & M. Feldbrugge, (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of Cell Science* **119**: 4964-4973.
- Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernández-Martínez, H. Berger, L. Araújo-Bazán, E. A. Espeso, R. Pachlinger, A. Gallmetzer, I. Anderl, C. Scazzocchio & J. Strauss, (2007) Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 791-802.

- Biedenkapp, H., U. Borgmeyer, A. E. Sippel & K. H. Klempnauer, (1988) Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature* **335**: 835-837.
- Bok, J. W. & N. P. Keller, (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic Cell* **3**: 527-535.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Busby, T. M., K. Y. Miller & B. L. Miller, (1996) Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics* **143**: 155-163.
- Butnick, N. Z., L. N. Yager, M. B. Kurtz & S. P. Champe, (1984) Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. *Journal of Bacteriology* **160**: 541-545.
- Calvo, A. M., (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1053-1061.
- Castillo, E. A., J. Ayte, C. Chiva, A. Moldon, M. Carrascal, J. Abian, N. Jones & E. Hidalgo, (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Molecular Microbiology* **45**: 243-254.
- Chae, K.-S., D.-M. Han & K.-H. Han, (2007) Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. In: *The Aspergilli*. CRC Press, pp. 279-299.
- Chang, Y. C. & W. E. Timberlake, (1993) Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* **133**: 29-38.
- Church, G. M. & W. Gilbert, (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 1991-1995.
- Cortese, M. S., O. Etxebeste, A. Garzia, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS ONE* **6**: e17505.

- D'Enfert, C., (1997) Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **21**: 163-172.
- De Souza, C. P. C., A. H. Osmani, S. B. Hashmi & S. A. Osmani, (2004) Partial Nuclear Pore Complex Disassembly during Closed Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Current biology* **14**: 1973-1984.
- De Souza, C. P. C. & S. A. Osmani, (2007) Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell* **6**: 1521-1527.
- Dohlman, H. G., J. Song, D. Ma, W. E. Courchesne & J. Thorner, (1996) Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Molecular and Cellular Biology* **16**: 5194-5209.
- Dyer, P. S., M. Paoletti & D. B. Archer, (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**: 2301-2303.
- Emri, T., Z. Molnár, M. Szilágyi & I. Pócsi, (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**: 211-220.
- Etxebeste, O., (2008) Nuevos genes involucrados en la inducción de la conidiación en *Aspergillus nidulans*. In: Dept. Química Aplicada. Donostia: EHU/UPV, pp.
- Etxebeste, O., A. Garzia, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology* **18**: 569-576.
- Etxebeste, O., E. Herrero-García, L. Araújo-Bazán, A. B. Rodríguez-Urra, A. Garzia, U. Ugalde & E. A. Espeso, (2009a) The bZIP-type transcription factor F1bB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **73**: 775-789.

- Etxebeste, O., A. Markina-Iñarrairaegui, A. Garzia, E. Herrero-García, U. Ugalde & E. A. Espeso, (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., M. Ni, A. Garzia, N. J. Kwon, R. Fischer, J. H. Yu, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **7**: 38-48.
- Fidel, S., J. H. Doonan & N. R. Morris, (1988) *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a alpha-actin. *Gene* **70**: 283-293.
- Fischer, R. & U. Kües, (2006) Asexual sporulation in mycelial fungi. In: The Mycota, Growth Differentiation and Sexuality. U. Kües, Fischer, R. (ed). Springer-Verlag, pp. 263-292.
- Foster, D. V., J. G. Foster, S. Huang & S. A. Kauffman, (2009) A model of sequential branching in hierarchical cell fate determination. *Journal of Theoretical Biology* **260**: 589-597.
- Furukawa, K., Y. Katsuno, T. Urao, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, H. Yamada-Okabe, Y. Yamagata, K. Abe & T. Nakajima, (2002) Isolation and Functional Analysis of a Gene, *tsbB*, Encoding a Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase from *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5304-5310.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Scazzocchio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D. Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M. Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman, D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P. Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani & B. W. Birren, (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.

- Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, R. Fischer, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Molecular Microbiology* **71**: 172-184.
- Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-García, U. Ugalde & E. A. Espeso, (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **75**: 1314-1324.
- Girbardt, M., (1957) Der *Spitzenkörper* von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta* **50**: 47-59.
- Glass, N. L., D. J. Jacobson & P. K. T. Shiu, (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**: 165-186.
- Glass, N. L., C. Rasmussen, M. G. Roca & N. D. Read, (2004) Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology* **12**: 135-141.
- Glover, J. N. M. & S. C. Harrison, (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c Jun bound to DNA. *Nature* **373**: 257-261.
- Han, K. H., J. A. Seo & J. H. Yu, (2004) Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Molecular Microbiology* **53**: 529-540.
- Harris, S. D., (1997) The Duplication Cycle in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **22**: 1-12.
- Harris, S. D. & M. Momany, (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 391-400.
- Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann & M. Momany, (2005) Polarisome meets *Spitzenkörper*: Microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryotic Cell* **4**: 225-229.

- Herrero-Garcia, E., A. Garzia, S. Cordobés, E. A. Espeso & U. Ugalde, (2011) 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology* **115**: 393-400.
- Hickey, P. C., D. J. Jacobson, N. D. Read & N. Louise Glass, (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 109-119.
- Horio, T., (2007) Role of microtubules in tip growth of fungi. *Journal of Plant Research* **120** 53-60.
- Horio, T. & B. R. Oakley, (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 918-926.
- Inglis, D. O. & A. D. Johnson, (2002) Ash1 protein, an asymmetrically localized transcriptional regulator, controls filamentous growth and virulence of *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 8669-8680.
- Jeong, H. Y., H. Kim, D. M. Han, K. Y. Jahng & K. S. Chae, (2003) Expression of the *mnpA* gene that encodes the mannoprotein of *Aspergillus nidulans* is dependent on *fadA* and *flbA* as well as *veA*. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 228-236.
- Käfer, E., (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217-232.
- Kwon, N. J., A. Garzia, E. A. Espeso, U. Ugalde & J. H. Yu, (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **77**: 1203-1219.
- Law, D. J. & W. E. Timberlake, (1980) Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **144**: 509-517.
- Lee, B. N. & T. H. Adams, (1994) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Development* **8**: 641-651.
- Lee, B. N. & T. H. Adams, (1996) FluG and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. *EMBO Journal* **15**: 299-309.

- Leeder, A. C., J. Palma-Guerrero & N. L. Glass, (2011) The social network: deciphering fungal language. *Nat Rev Micro* **9**: 440-451.
- Mah, J. H. & J. H. Yu, (2006) Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* **5**: 1585-1595.
- Maier, A. T., S. Stehling-Sun, H. Wollmann, M. Demar, R. L. Hong, S. Haubeiss, D. Weigel & J. U. Lohmann, (2009) Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development* **136**: 1613-1620.
- Markina-Iñarrairaegui, A., (2011) Rutas de transporte núcleo-citoplásmicas en *Aspergillus nidulans*. In: Dept. Medicina Celular y Molecular. Madrid: Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), pp.
- Marshall, M. A. & W. E. Timberlake, (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 55-62.
- Maxam, A. M. & W. Gilbert, (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.
- Miller, B. L., J. Wu & K. Y. Miller, (1993) The *medA* gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Biochem.* **17 C**: 144.
- Miller, K. Y., J. Wu & B. L. Miller, (1992) StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and Development* **6**: 1770-1782.
- Mims, C. W., E. A. Richardson & W. E. Timberlake, (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **144**: 132-141.
- Mirabito, P. M., T. H. Adams & W. E. Timberlake, (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859-868.
- Momany, M., (2002) Polarity in filamentous fungi: Establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 580-585.

- Mooney, J. L., D. E. Hassett & L. N. Yager, (1990) Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**: 869-874.
- Mooney, J. L. & L. N. Yager, (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes and Development* **4**: 1473-1482.
- Morton, A. G., (1961) The induction of sporulation in mould fungi. *Proc.R.Microsp.Soc.B.* **153**: 548-569.
- Nayak, T., E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani & B. R. Oakley, (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Ness, S. A., A. Marknell & T. Graf, (1989) The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific *mim-1* gene. *Cell* **59**: 1115-1125.
- Ni, M., N. Gao, N. J. Kwon, K. S. Shin & J. H. Yu, (2010) Regulation of *Aspergillus* conidiation. In: In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi K. A. Borkovich, Ebbole, D.J. (ed). ASM Press, pp. 559-576.
- Ni, M. & J.-H. Yu, (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **2**: e970.
- Nielsen, M. L., J. B. Nielsen, C. Rank, M. L. Klejnstrup, D. M. K. Holm, K. H. Brogaard, B. G. Hansen, J. C. Frisvad, T. O. Larsen & U. H. Mortensen, (2011) A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*: no-no.
- Nierman, W. C., G. May, H. S. Kim, M. J. Anderson, D. Chen & D. W. Denning, (2005) What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med.Mycol* **43 Suppl 1**: S3-S5.
- Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst Jr & M. A. Peñalva, (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes and Development* **9**: 1622-1632.

- Orlando, V., H. Strutt & R. Paro, (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **11**: 205-214.
- Oshero, N., J. Mathew & G. S. May, (2000) Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 181-188.
- Oshero, N. & G. S. May, (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters* **199**: 153-160.
- Peñalva, M. A., (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 963-975.
- Pócsi, I., É. Leiter, N. J. Kwon, K. S. Shin, G. S. Kwon, T. Pusztahelyi, T. Emri, R. A. Abuknesha, R. G. Price & J. H. Yu, (2009) Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 514-523.
- Polley, S. D. & M. X. Caddick, (1996) Molecular characterisation of *meaB*, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Letters* **388**: 200-205.
- Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Chemmons, K. D. Macdonald & A. W. J. Bufton, (1953) The Genetics of *Aspergillus nidulans*. In: *Advances in Genetics*. pp. 141-238.
- Prade, R. A. & W. E. Timberlake, (1993) The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO Journal* **12**: 2439-2447.
- Pruyne, D. & A. Bretscher, (2000) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of Cell Science* **113**: 365-375.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher & C. Boone, (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**: 612-615.

- Purschwitz, J., S. Müller & R. Fischer, (2009) Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics* **281**: 35-42.
- Purschwitz, J., S. Müller, C. Kastner, M. Schöser, H. Haas, E. A. Espeso, A. Atoui, A. M. Calvo & R. Fischer, (2008) Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology* **18**: 255-259.
- Read, N. D., A. Lichius, J.-Y. Shoji & A. B. Goryachev, (2009) Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 608-615.
- Reynaga-Pena, C. G., G. Gierz & S. Bartnicki-Garcia, (1997) Analysis of the role of the *Spitzenkörper* in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 9096-9101.
- Richman, T. J., M. M. Sawyer & D. I. Johnson, (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryotic Cell* **1**: 458-468.
- Riquelme, M., R. Fischer & S. Bartnicki-Garcia, (2003) Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **222**: 211-215.
- Riquelme, M., G. Gierz & S. Bartnicki-Garcia, (2000) Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the *Spitzenkörper* and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146**: 1743-1752.
- Rodríguez-Romero, J., M. Hedtke, C. Kastner, S. Müller & R. Fischer, (2010) Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light Makes a Difference. In: Annual Review of Microbiology. Annual Reviews, pp. 585-610.
- Rodríguez-Urra, A. B., C. Jimenez, M. Dueñas & U. Ugalde, (2009) Bicarbonate gradients modulate growth and colony morphology in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* **300**: 216-221.
- Roncal, T., S. Cordobés, O. Sterner & U. Ugalde, (2002) Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryotic Cell* **1**: 823-829.

- Roncal, T. & U. Ugalde, (2003) Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology* **154**: 539-546.
- Rosén, S., J. H. Yu & T. H. Adams, (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO Journal* **18**: 5592-5600.
- Sagot, I., I. Sagot, S. K. Klee, S. K. Klee, D. Pellman & D. Pellman, (2002a) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol* **4**: 42-50.
- Sagot, I., I. Sagot, A. A. Rodal, A. A. Rodal, J. Moseley, J. Moseley, B. L. Goode, B. L. Goode, D. Pellman & D. Pellman, (2002b) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**: 626-631.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Seo, J. A., Y. Guan & J. H. Yu, (2003) Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**: 1083-1093.
- Seo, J. A., Y. Guan & J. H. Yu, (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544.
- Seo, J. A., K. H. Han & J. H. Yu, (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 81-89.
- Sewall, T. C., (1994) Cellular effects of misscheduled *brlA*, *abaA*, and *wetA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 1035-1042.
- Sewall, T. C., C. W. Mims & W. E. Timberlake, (1990a) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**: 731-739.
- Sewall, T. C., C. W. Mims & W. E. Timberlake, (1990b) Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Developmental Biology* **138**: 499-508.

- Skromne, I., O. Sanchez & J. Aguirre, (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21-28.
- Smith, J. E. & D. R. Berry, (1974) *An Introduction to the Biochemistry of Fungal Development*. London & New York: Academic Press.
- Soid-Raggi, G., O. Sánchez & J. Aguirre, (2006) TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **59**: 854-869.
- Spröte, P. & A. A. Brakhage, (2007) The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Archives of Microbiology* **188**: 69-79.
- Steinberg, G., (2007) Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. *Trends in Microbiology* **15**: 14-21.
- Stinnett, S. M., E. A. Espeso, L. Cobeño, L. Araújo-Bazán & A. M. Calvo, (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Molecular Microbiology* **63**: 242-255.
- Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall & W. E. Timberlake, (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes and Development* **5**: 1161-1171.
- Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araújo-Bazán, X. Dou, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, S. A. Osmani & B. R. Oakley, (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 1439-1449.
- Tahirov, T. H., K. Sato, E. Ichikawa-Iwata, M. Sasaki, T. Inoue-Bungo, M. Shiina, K. Kimura, S. Takata, A. Fujikawa, H. Morii, T. Kumasaka, M. Yamamoto, S. Ishii & K. Ogata, (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* **108**: 57-70.
- Takeshita, N., Y. Higashitsuji, S. Konzack & R. Fischer, (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 339-351.

- Thom, C. & K. B. Raper, (1945) A manual of the Aspergilli. In: Williams & Wilkins Co. Baltimore, pp. 197.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio & G. G. Taylor, (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.
- Todd, R. B., M. A. Davis & M. J. Hynes, (2007a) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat.Protocols* **2**: 822-830.
- Todd, R. B., M. A. Davis & M. J. Hynes, (2007b) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat.Protocols* **2**: 811-821.
- Virag, A. & S. D. Harris, (2006) The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycological Research* **110**: 4-13.
- Virginia, M., C. L. Appleyard, W. L. McPheat & M. J. Stark, (2000) A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **37**: 364-372.
- Waring, R. B., G. S. May & N. R. Morris, (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**: 119-130.
- Wieser, J. & T. H. Adams, (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes and Development* **9**: 491-502.
- Wieser, J., B. N. Lee, J. W. Fondon lli & T. H. Adams, (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **27**: 62-69.
- Wolkow, T. D., S. D. Harris & J. E. Hamer, (1996) Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *Journal of Cell Science* **109**: 2179-2188.

- Yager, L. N., H. O. Lee, D. L. Nagle & J. E. Zimmerman, (1998) Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**: 1777-1786.
- Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies, C. P. C. De Souza, X. Dou, A. Perez-Balaguer & S. A. Osmani, (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **3**: 1359-1362.
- Yu, J. H., (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology* **44**: 145-154.
- Yu, J. H., J. H. Mah & J. A. Seo, (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryotic Cell* **5**: 1577-1584.
- Zarnack, K. & M. Feldbrügge, (2007) mRNA trafficking in fungi. *Molecular Genetics and Genomics* **278**: 347-359.
- Zheng, Y., A. Bender & R. A. Cerione, (1995) Interactions among proteins involved in Bud-site selection and Bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 626-630.
- Zhu, C., K. J. R. P. Byers, R. P. McCord, Z. Shi, M. F. Berger, D. E. Newburger, K. Saulrieta, Z. Smith, M. V. Shah, M. Radhakrishnan, A. A. Philippakis, Y. Hu, F. De Masi, M. Pacek, A. Rolfs, T. Murthy, J. Labaer & M. L. Bulyk, (2009) High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Research* **19**: 556-566.
- Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J. M. O'Brien, D. Botstein & D. I. Johnson, (1993) Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP- binding protein involved in the control of cell polarity. *Molecular Biology of the Cell* **4**: 1307-1316.